

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Dr. med. vet. Claudio Venzin, Dipl. ECVS, Klinik für Kleintierchirurgie
und Dr. med. vet. Katja Nuss, Musculoskeletal Research Unit (MSRU)

Untersuchungen zur Wirkung eines PEG-Hydrogels auf die Wundheilung von Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Valentine Jacot

Tierärztin

von Le Locle (NE), La Chaux-de Fonds (NE)

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Hauptreferentin

Prof. em. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

2016

Meinen Eltern

Marie-Anne und Vincent

&

Meiner Schwester und meinem Bruder

Sabine und Julien

&

Meinem Freund

Mehdy

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY.....	1
3. EINLEITUNG	2
3.1. HINTERGRUND UND ZIEL DER STUDIE	2
4. LITERATURÜBERSICHT.....	3
4.1. ANATOMIE, PHYSIOLOGIE UND FUNKTION DER HAUT	3
4.2. WUNDHEILUNG	4
4.2.1. Einteilung der Wundheilung	4
4.2.2. Phasen der Wundheilung.....	5
4.2.3. Aktuelle Wundbehandlung mit Wundauflagen.....	8
4.3. HYDROGELE	10
4.3.1. Zusammensetzung und Funktionen.....	10
4.3.2. Anwendungsmöglichkeiten der Hydrogele	16
5. MATERIAL UND METHODEN	18
5.1. HYDROGEL	18
5.2. IN VIVO STUDIE	18
5.2.1. Versuchstiere	18
5.2.2. Aufbau der in vivo Studie	19
5.2.3. Operation	21
5.2.4. Postoperatives Management.....	21
5.2.5. Euthanasie	22
5.3. PROBENGEWINNUNG UND -AUFARBEITUNG	22
5.4. UNTERSUCHUNGSMETHODEN UND PROBENAUSWERTUNG	23
5.4.1. Makroskopische Auswertung, Wundheilungsverlauf	23
5.4.2. Histologische Auswertung	23
5.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG	27
6. RESULTATE.....	28
6.1. IN VIVO STUDIE	28
6.1.1. Operation	28
6.1.2. Postoperative Phase.....	28
6.2. MAKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	29
6.2.1. Wundheilungsverlauf	29
6.3. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	31
6.3.1. 7-Tages-Gruppe.....	31
6.3.2. 14-Tages-Gruppe.....	46
6.3.3. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe	61
6.4. IMMUNHISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	76
6.4.1. 7-Tages-Gruppe.....	76
6.4.2. 14-Tages-Gruppe.....	77
6.4.3. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe	78
6.5. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG: AUSGEMESSENE UND BERECHNETE PARAMETER.....	79
6.5.1. 7-Tages-Gruppe.....	79
6.5.2. 14-Tages-Gruppe.....	86
6.5.3. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe	93

7. DISKUSSION	100
7.1. IN VIVO STUDIE	100
7.1.1. Diskussion der Methoden.....	100
7.1.2. Diskussion der Resultate	102
7.1.3. Limitierung der Studie	107
8. LITERATURVERZEICHNIS/REFERENZEN.....	108
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	115
10. ANHANG	118
10.1. ABBILDUNGEN	118
10.1.1. In vivo Studie	118
11. DANKSAGUNG	
12. CURRICULUM VITAE	

1. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Preliminärstudie wurde untersucht, ob sich ein PEG-Fibrinogen Hydrogel als eine dreidimensionale Hautreparaturmatrix eignet. Dies erfolgte anhand einer in vivo Studie, die an 6 Ratten durchgeführt wurde. Vier standardisierte und randomisierte Hautwunden von je 8 mm Durchmesser wurden in die Rückenhaut jeder Ratte gestanzt. Danach wurden zwei Wunden mit PEG-Fibrinogen Hydrogel bedeckt, die anderen zwei Wunden wurden nicht behandelt. Die Tiere wurden nach 7 (n=3) bzw. 14 Tagen (n=3) euthanasiert. Die Hautwunden wurden entnommen und histologisch sowie immunhistologisch untersucht.

Das PEG-Fibrinogen Hydrogel wurde als biokompatibel angesehen, da histologisch anhand der evaluierten Zellzahlen keine ungewöhnliche Entzündungsreaktion festgestellt werden konnte. Ausserdem hat das Einbringen des PEG-Fibrinogen Hydrogels keinen zusätzlichen mechanischen Stress im Sinne einer übermässigen Wundkontraktion bewirkt. Dies konnte anhand des immunhistologischen Nachweises der α -SMA Expression nachgewiesen werden. Die Applikation des Hydrogels zeigte keinen beschleunigenden Effekt auf die Wundheilung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollwunden, jedoch qualitative Aspekte wie Narbendicke und weniger Variabilität in der Wundheilung wurden beim Hydrogel beobachtet.

Das PEG-Fibrinogen Hydrogel stellt somit ein geeignetes Biomaterial als dreidimensionale Matrix für die Applikation in Hautwunden dar. In Folgestudien könnte das Hydrogel funktionalisiert (z.B. mit Wachstumsfaktoren) und z.B. in einem Modell mit chronischen und / oder infizierten Wunden getestet werden.

2. SUMMARY

This preliminary study aimed to assess the suitability of a PEG-fibrinogen hydrogel as a three-dimensional skin repair matrix. This was investigated in an in vivo wound-healing model study in 6 rats. Four standardized full-thickness skin wounds were created on the back of the animals. The survival times were seven (n=3) and fourteen days (n=3), respectively. Untreated wounds served as negative controls and the distribution of the wounds was determined according to a randomized protocol. The skin wounds were evaluated histologically and immunohistologically. The biocompatibility of PEG-fibrinogen hydrogel in skin defects was proved because no excessive inflammation reaction was observed histologically. The application of this hydrogel showed no acceleration of woundhealing compared to the negative controls. However, qualitative improvement in scar thickness and less variability in wound healing were noticed in hydrogel treated wounds. Using the PEG-fibrinogen hydrogel has caused no additional mechanical stress like an increased wound contraction in the wound. This could be shown immunohistologically by determining the expression of α -SMA. The PEG-fibrinogen hydrogel therefore can be stated as a suitable biomaterial for a three-dimensional skin repair matrix. Further studies may be reasonable, where agents that enhance wound healing are added. Additionally, the PEG-Fibrinogen hydrogel may be tested in chronic or infected wounds.

3. EINLEITUNG

3.1. HINTERGRUND UND ZIEL DER STUDIE

Zusammenhangstrennungen der Haut heilen je nach Schweregrad der Wunde häufig unter Bildung eines Ersatzgewebes ab. Diese Narbenbildung soll die möglichst schnelle Wiederherstellung der Kontinuität der Haut sowie die Integrität ihrer Funktionen ermöglichen. Wundheilung ist ein komplexer Vorgang, über den in den letzten Jahrzehnten intensiv geforscht und dafür neue Behandlungsansätze entwickelt wurden. Komplizierte Hautwunden sind in der Veterinärmedizin ein häufiger Vorstellungsgrund, oft verbunden mit langen Behandlungsperioden und hohen Kosten. Die kosmetischen Resultate können manchmal unbefriedigend sein. Ziel der Wundheilungsforschung ist unter anderem, Produkte zu entwickeln, welche die Wundheilung beschleunigen und Komplikationen sowie übermäßige Narbenbildung vermindern.

Moderne Wundauflagen sind in der Lage, ein feuchtes Wundmilieu zu gewährleisten, spezifische Wirkstoffe freizusetzen und mit Zellen der Wunde zu interagieren (1). Verschiedene Klassen dieser „bimaterial scaffolds“ weisen diese Eigenschaften auf, wie z.B. die häufig verwendeten Hydrogele. Sie bestehen aus dreidimensionalen polymerisierten Materialien, die aus quervernetzten hydrophilen polymeren Ketten bestehen und sich durch einen sehr hohen Wassergehalt (von 20% bis 90%) auszeichnen (2). Im Rahmen der Wundheilung bildet diese dreidimensionale polymerisierte Matrix zusammen mit Patientenzellen ein Gerüst, das den Eigenschaften und Funktionen der natürlichen Matrix ähnelt, beziehungsweise deren Bildung unterstützt oder optimiert. Dieses Konstrukt verleiht dem heilenden Gewebe ein physisches Gerüst für die Zelleinwanderung und Angiogenese und kann zusätzlich lokal spezifische Substanzen oder Faktoren freisetzen, die die Gewebereparation einleiten oder fördern können (3).

Biomaterialien für die Hautregeneration sind häufig resorbierbar und bestehen aus natürlichen, synthetischen oder halb-synthetischen Komponenten. Die *natürlichen* Komponenten wie zum Beispiel Kollagen oder Fibrin können über biofunktionelle Signale die Geweberegeneration fördern. Ihre mechanische und biologische Instabilität stellt aber einen Nachteil dar, da sie nicht bis zum Ende des Heilungsprozesses in der Wunde verbleiben. Im Gegensatz zu synthetischen Materialien ist ihre Biodegradation nicht exakt vorhersagbar und sie weisen eine grosse natürliche Variabilität zwischen den einzelnen Chargen auf. Grosse Vorteile der häufig eingesetzten *synthetischen* Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) sind die leicht kontrollierbare Degradierung und die stabilen physikalischen Eigenschaften. Sie weisen aber im Vergleich zu natürlichen Komponenten mangelhafte adhäsive Eigenschaften mit der zellulären Umgebung auf und zeigen keine Bioaktivität (4, 5). Die halb-synthetischen Hydrogele setzen sich aus linearen oder verzweigten, nicht ionischen hydrophilen Polymeren zusammen, die durch eine kovalente Verbindung mit gewissen Proteinen der extrazellulären Matrix verbunden sind. Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise Fibrinogen, Kollagen, Albumin, Hyaluronsäure, Alginat und Chitosan (3, 6,-8).

In der vorliegenden Studie bestand das zu untersuchende Hydrogel aus dem synthetischen PEG-DA (Polyethylene (glykol) Diakrylat), das mit einem denaturierten humanen Fibrinogen kombiniert wurde. PEG-Fibrinogen wurde bereits *in vitro* (6-14) und *in vivo* in Knochen(15), Herz (16-17) und Muskel (18) eingesetzt aber noch nicht für die Therapie von Hautwunden verwendet. Diese Preliminärstudie hat zum Ziel die Eignung des PEG-Fibrinogen Hydrogels als eine dreidimensionale Hautreparaturmatrix zu bewerten. Dafür wurden standardisierte full-thickness Hautwunden auf dem Rücken von Ratten gesetzt. Die Wunden wurden

entweder mit PEG-Fibrinogen Hydrogel beschichtet oder blieben als Kontrollwunden unbehandelt. Die Überlebenszeit betrug 7 (n=3 Tiere) oder 14 (n=3 Tiere) Tage. Anhand von histologischen und immunhistologischen Untersuchungen sollten Aussagen über Entzündungsreaktion, Wundschluss und Narbenbildung getroffen werden.

Die Hypothesen dieser Studien waren:

1. Das flüssige PEG-Fibrinogen Hydrogel kann in eine Hautwunde appliziert und durch Bestrahlung mit UV-Licht polymerisiert werden
2. Das PEG-Fibrinogen Hydrogel ist resorbierbar, biokompatibel und beschleunigt die Wundheilung

4. LITERATURÜBERSICHT

4.1. ANATOMIE, PHYSIOLOGIE UND FUNKTION DER HAUT

Die Haut stellt eines der grössten Organe des Körpers dar und spielt mit ihren vielfältigen Funktionen eine bedeutsame Rolle. Die Körperoberfläche (Integumentum commune) ist diversen biologischen, chemischen, physikalischen und mechanischen Noxen ausgesetzt. Sie ist eine mechanische Barriere und für die Erhaltung der Integrität des Organismus verantwortlich.

Dank dem Vorhandensein von verschiedenen spezifischen Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und antigenpräsentierenden Zellen (Langerhans-Zellen und Lymphozyten), stellt die Haut einen zusätzlichen immunologischen Schutz dar (19).

Das Haarkleid, das Fettgewebe, die intensive Durchblutung und je nach Spezies die Schweissdrüsen verleihen der Haut zudem eine wesentliche Rolle in der Thermoregulation. Die Haut besitzt diverse sensible Rezeptoren, die die lebenswichtige Rolle der Haut als Sinnesorgan ermöglichen. Unter der Einwirkung von Sonnenlicht wird in der Epidermis (Oberhaut) Vitamin D3 synthetisiert (19).

Die Epidermis

Die Haut besteht aus verschiedenen übereinander liegenden Schichten. Die Epidermis (Oberhaut) ist gefässfrei und besteht aus bis zu fünf morphologisch eindeutig definierten Zelllagen: Dem Stratum basale, dem Stratum spinosum, dem Stratum granulosum, dem Stratum lucidum und dem Stratum corneum. Je nach mechanischer Beanspruchung ist die Haut unterschiedlich dick und unterschiedlich behaart. Je behaarter ein Hautbezirk, desto dicker ist die Oberhaut.

Das Hautepithel ist ein verhornendes mehrschichtiges Plattenepithel und hauptsächlich aus Keratinozyten aufgebaut. Jedem Differenzierungsgrad der Keratinozyten entspricht eine bestimmte Zellschicht mit dem entsprechenden Keratinisierungsgrad:

Das Stratum basale steht direkt mit dem darunterliegenden Stratum papillare, der Dermis (Lederhaut) über spezielle Kollagenfibrillen (Ankerfibrillen) in Verbindung. Sie besteht hauptsächlich aus einer Schicht kubisch-zylindrischer Basalzellen (Stammzellen). In

geringerer Anzahl enthält sie auch andere Zellen wie zum Beispiel Antigen-präsentierende Zellen (Langerhans-Zellen), Mechanosensorenzellen (Merkel-Zellen) und Melanozyten.

Das Stratum spinosum (Stachelzellschicht) fungiert zusammen mit dem Stratum basale als Stratum germinativum (Keimschicht). Die Zellen haben ein kubisches Aussehen, mit nach aussen hin zunehmend abgeflachter Form.

Das Stratum granulosum (Körnerschicht) ist nur in verhornendem Epithel vorhanden und besteht aus 1 bis 3 Lagen polygonaler abgeflachter Zellen, die Keratohyalin granula, eine Vorstufe von Keratin enthalten.

Das Stratum lucidum findet sich nur in unbehaarter Haut. Charakteristisch für diese Schicht ist das Vorhandensein eines bestimmten durchsichtigen und keratinähnlichen Proteins: Des Eleidins.

Das Stratum corneum (Hornschicht) stellt die oberflächlichste Schicht der Epidermis dar und besteht aus mehreren Schichten toter Keratinozyten.

Die Dermis

Die Dermis besteht vorwiegend aus Bindegewebe, Blut- und Lymphgefässen und enthält Hautannexen wie zum Beispiel Talg- und Schweißdrüsen, Haarfollikel und ein Netzwerk von vegetativen und sensiblen Nerven. Dank ihrer Papillen, die sich mit der Epidermis verzahnen, verleiht sie der Haut eine ausreichende mechanische Stabilität. Bei stark beanspruchten Hautgebieten nimmt die Zahl der Papillen dementsprechend zu. Man unterscheidet in der Lederhaut zwei unterschiedliche Schichten:

Das Stratum reticulare steht direkt mit der darunterliegenden Hypodermis (Unterhaut) in Verbindung, ist dicker als das Stratum papillare und besteht aus unregelmässigem, straffem Bindegewebe. Die extrazelluläre Matrix dieser Schicht besteht aus Kollagen Typ 1.

Das Stratum papillare besitzt im Vergleich zum Stratum reticulare weniger Fasern und ist vorwiegend aus lockerem Bindegewebe, Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen aufgebaut. In der extrazellulären Matrix dieses Stratum befindet sich vor allem Kollagen Typ 3 und 4. Die Verbindung zwischen der Basallamina der Epidermis und der Dermis wird durch spezifische Kollagenfibrillen (Ankerfibrillen) gewährleistet.

Die Hypodermis

Sie verbindet die Haut mit den darunterliegenden Strukturen (Muskeln und Faszien) und besteht hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe und Fettzellen, enthält aber auch Blutgefässe und verfügt über Zellen des Immunsystems (19).

4.2. WUNDHEILUNG

4.2.1. EINTEILUNG DER WUNDHEILUNG

Hautwunden sind Verletzungen, die mit einer Unterbrechung der Hautintegrität einhergehen. Die Wundheilung wird unmittelbar nach der Verletzung aktiviert, mit dem Ziel, den Defekt zu verschliessen und das traumatisierte Gewebe zu ersetzen oder wieder herzustellen (20). Es

gibt drei verschiedenen Wundheilungstypen: Die Primärheilung, die verzögerte Primärheilung und die Sekundärheilung (20, 21).

Die Primärheilung ist wegen ihres funktionellen und ästhetischen Resultates der ideale Wundheilungstyp. Für eine Primärheilung müssen gewisse Bedingungen erfüllt sein: Die Wunde muss sauber und ohne Fremdkörper sein und die Durchblutung und nervale Versorgung des umliegenden Gewebes müssen intakt sein. Die Wundränder sollten ohne Zugbelastung abheilen können, so dass sie unmittelbar verkleben und verwachsen können. Kleine und saubere Wunden, die innerhalb von 12-24 Stunden aseptisch chirurgisch versorgt werden unterliegen der Primärheilung (21). Die Sekundärheilung findet bei Wunden statt, welche die Bedingungen für die Primärheilung nicht erfüllen: Beispielsweise bei einem grossen Gewebedefekt, bei avitalen Wundrändern oder aufgrund einer starken Kontamination (Fremdmaterial, Bakterien, nekrotisches Gewebe usw.). Die Entzündungsphase (siehe 4.2.2) ist hier deutlich länger und intensiver, da Bakterien und nekrotisches Gewebe zuerst eliminiert werden müssen. Danach füllt sich der Defekt in mehreren Phasen auf, gefolgt von der Bildung eines neuen Epithels. Schlussendlich erfolgt die Modellierung des neuen Gewebes in Umbau- und Reifungsphasen. Alle diese Vorgänge können die Heilungszeit deutlich verlängern (20, 21). Die verzögerte Primärheilung stellt eine Kombination aus anfänglicher Sekundärheilung mit anschliessender Primärheilung dar. Typischerweise handelt es sich um kontaminierte Wunden, die erst einige Tage (zwischen der Entzündungs- und Proliferationsphase) nach ihrer Entstehung chirurgisch verschlossen werden (21).

4.2.2. PHASEN DER WUNDHEILUNG

Die Wundheilung besteht aus einer Reihe von komplexen physiologischen Vorgängen mit dem Ziel, traumatisierte Hautgebiete zu strukturell intakter und funktioneller Haut umzuwandeln. Der Verschluss eines Gewebedefektes kann entweder durch Regeneration oder Reparation des Gewebes erfolgen. *Regeneration* bedeutet eine restitutio ad integrum ohne Narbenbildung. Dies ist nur bei oberflächlichen Hautverletzungen möglich, bei denen nur die Epidermis verletzt ist. Sobald die Dermis mit betroffen ist, heilt die Haut durch *Reparation* aus. Dabei entsteht ein minderwertiges, faserreiches Ersatzgewebe, das weniger funktionsfähig ist, das sogenannte Narbengewebe. Dieses Ersatzgewebe hat die Funktion, den Hautdefekt zu verschliessen und ist nicht zu allen zellulären Differenzierungsformen fähig. Es fehlen Hautanhangsgebilde wie Haare oder Schweissdrüsen.

Der *Reparations*ablauf wird gewöhnlich in 3 Phasen unterteilt: Die Entzündungsphase, die Proliferationsphase und die Maturationsphase (20). Alle Phasen hängen voneinander ab und verlaufen teilweise zeitlich überlappend. Die Wiederherstellung von geschädigten Geweben wird von bestimmten zellulären Komponenten wie Zytokinen und Chemokinen gesteuert. Zur Zytokingruppe gehören: PDGF, TGF- α , TGF- β , EGF, FGF, KGF, IGF-1 und VEGF, die von verschiedenen Zellen (Thrombozyten, Neutrophile, Makrophagen, T-Lymphozyten, endotheliale Zellen, Keratinozyten und Fibroblasten) synthetisiert und ausgeschüttet werden (20).

Die Entzündungsphase

Die meisten Hautverletzungen gehen mit einer Gefässverletzung einher. Das verletzte Gefässendothel schüttet Endothelin aus, was zusammen mit anderen Entzündungsfaktoren (Prostaglandine, Epinephrin und Norepinephrin) eine lokale Vasokonstriktion verursacht (21). Gleichzeitig wird die Koagulationskaskade initiiert, die nach Thrombozytenaggregation und Degranulation mit der Bildung eines Fibrinclots endet. Dieser Clot besteht aus einem

Netzwerk von Fibrin, plasmatischem Fibronektin, Vitronektin, Thrombospondin und aggregierten Blutplättchen. Diese dienen als initiale extrazelluläre Matrix für die Keratinozyten und stellen gleichzeitig einen temporären Wundverschluss dar (20).

Die Granula der aktivierten Thrombozyten enthalten PDGF, EGF, VEGF, FGF und TGF- β , die eine lokale Leukozyten-Migration innerhalb der ersten 24-48 Stunden initiieren, zusammen mit den vasodilatierenden Faktoren Leukotrien, Prostaglandin, Histamin und Kinin (20).

Als Antwort auf bestimmte Chemoattraktoren wie TGF- β wandern die Monozyten in die Hautverletzung ein und reifen dort zu aktivierten Makrophagen. Als Produzenten von Zytokinen und Wachstumsfaktoren spielen diese Zellen eine unerlässliche Rolle während der Entzündungsphase. Dank ihrer spezifischen Rezeptoren binden sie an die Integrin-Liganden der extrazellulären Matrix und leiten auf diese Weise die Phagozytose von Debris, Mikroorganismen und Matrixfragmenten ein. Dies führt zu einer erleichterten Zellwanderung durch das Gewebe. Die Makrophagen repräsentieren die Hauptimmunzellpopulation 48-96 Stunden nach der Verletzung (22). Diese Phase ist klinisch charakterisiert durch Hautrötung und -ödem und dauert 1-3 Tage.

Die Proliferationsphase

Zeitlich überlappend mit der Entzündungsphase findet die Proliferationsphase statt, die je nach Spezies ungefähr 10 Tage dauert und durch Angiogenese, Kollagenproduktion, Wundkontraktur und Wundverschluss gekennzeichnet ist (21). Während dieser Periode spielen Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen die Hauptrolle.

Ungefähr 3 Tage nach Beginn des Wundheilungsprozesses bildet sich Granulationsgewebe in der Wunde.

Charakteristisch für dieses Gewebe ist dessen intensive Durchblutung, bedingt durch das Einwachsen von neuen Blutgefäßen aus der Wundperipherie. Dieser Vorgang verläuft als Antwort auf die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF, die vorwiegend von Keratinozyten aber auch von Makrophagen, Blutplättchen, Endothelzellen und Fibroblasten produziert werden (20).

Die von Thrombozyten und Makrophagen sezernierten Faktoren PDGF, TGF- β und EGF induzieren die Einwanderung von Fibroblasten aus dem umliegenden Gewebe. Der Wachstumsfaktor PDGF steuert zusätzlich die Produktion von Glykosaminoglykan, Fibronektin und von Kollagen Typ 3 in den Fibroblasten (23). Die Hauptwirkungen von TGF- β sind die hemmende Wirkung auf Matrixmetalloproteinasen (MMP) und die Anregung der Kollagen-Typ-1-Synthese (24). Als Antwort auf TGF- β 1 wandeln sich die rekrutierten Fibroblasten in Myofibroblasten um, die später die Wundkontraktion und damit eine Verkleinerung der Wundfläche bewirken (20) (siehe unten „Wundkontraktion“).

Typisch für dieses Stadium ist das Auftreten von Granulationsgewebe, das aus einem Netzwerk von Fibronektin, Kollagen und Hyaluronsäure als Grundsubstanz besteht. Dabei sind die Makrophagen und Fibroblasten die Hauptzellpopulation (20). Dem sehr gut entwickelten Kapillarnetzwerk verdankt das Gewebe seine intensive Durchblutung, die für den Heilungsverlauf entscheidend ist. Die Epithelisierung ist von aktivierten Makrophagen und Thrombozyten abhängig, da sie EGF und TGF- α produzieren, was mit einer Proliferation der Epithelzellen aus der Peripherie der Wunde einhergeht. Diese sich teilenden Zellen wandern in das Zentrum der Verletzung ein und verhindern eine potentielle bakterielle Infektion. Die Epithel- und Endothelzellen produzieren Matrix-Metalloproteinasen, die das Fibrinnetzwerk abbauen. Damit wird die Migration von Epithelzellen erleichtert. Diese

Migration endet, sobald die wandernden Zellen miteinander in Kontakt treten (Kontaktinhibition).

Die Maturationsphase

Anschliessend zum äusseren Verschluss der Hautwunde beginnt die letzte Phase der Wundheilung mit Umbauvorgängen der temporären Matrix. Fibronectin und Hyaluronsäure, die anfänglich für die Zellproliferation und -migration verantwortlich waren, werden abgebaut und durch eine festere Matrix ersetzt, die sich hauptsächlich aus elastischen Fasern, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Kollagen zusammensetzt (25). Im Granulationsgewebe waren die Fibrillen parallel zueinander angeordnet, dünn, und mehr glykolisiert, welches die Stärke der Matrix negativ beeinflusst. Während der Remodelierungsphase reduziert sich der Kollagen Typ 3-Gehalt von 40% auf 10% (26). 21 Tage nach der Hautverletzung hat die neugebildete Haut bereits wieder 30% ihrer ursprünglichen Stärke.

Als Antwort auf mechanischen Stress und den Einfluss von TGF- β greifen die Fibroblasten in diesen Vorgang ein, indem sie Glykosaminoglykane und Proteoglykane produzieren, sezernieren und sich zu Myofibroblasten umwandeln. Diese Transformation verläuft aber nur in mechanisch beanspruchter Matrix. Die Kollagensynthese endet 4 bis 5 Wochen nach dem initialen Trauma, während die Hautreifung für 12 bis 18 Monate fortschreitet (20). Eine übermässige mechanische Beanspruchung einer heilenden Wunde resultiert in einer exzessiven Kollagenbildung, was sich in einer Kontraktur manifestieren kann (25). Drei Monate nach dem Beginn der Wundheilung hat die Wunde maximal 80% ihrer initialen Stärke wieder erlangt. Zu diesem Zeitpunkt wird das Kollagen reabsorbiert und parallel zu den Stresslinien der Haut neu angeordnet.

Wundkontraktion

Als Wundkontraktion wird die Verminderung einer Wundoberfläche durch ein zentripetales Zusammenziehen der umliegenden Haut definiert. Dieser Vorgang spielt in der Sekundärheilung eine wichtige Rolle, im Gegensatz zur Primärheilung, wo sie fast nicht vorkommt. Die Wundkontraktion ist besonders wirksam in Bereichen, in denen die Haut locker mit dem darunterliegenden Gewebe verbunden ist (27, 28). Die Ausprägung der Kontraktion hängt vor allem vom Granulationsgewebe und weniger von der Epithelisierung ab. Der Vorgang fängt ungefähr eine Woche nach der Hautverletzung an, wenn die Wunde mit Granulationsgewebe aufgefüllt ist. Die Wundkontraktion schreitet gleichmässig fort und hört bei den meisten Spezies auf, wenn die Wundränder in Kontakt kommen. Die Wundkontraktion kann aber auch bereits vorher aufhören und dann keine optimale Sekundärheilung gewährleisten. Ein häufiger Grund für ein frühzeitiges Sistieren der Wundkontraktion kann eine entgegengesetzt gerichtete periphere Zugspannung sein, die gleich oder grösser als die Zugkraft oder die Fibrose des Granulationsgewebes ist. Übermässige periphere Hautspannung findet man bei grossen Hautdefekten oder wenn die an die Wunde angrenzende Haut sehr fest aufliegend und damit wenig mobil ist. Haut an den Gliedmassen ist prädisponiert für diese Komplikation. Wenn die Wundkontraktion auf Grund hoher peripherer Hautspannung frühzeitig sistiert, muss die Wundabdeckung durch einen grösseren Anteil an Epithelisierung erfolgen, was die Heilungszeit verlängert. Das dort gebildete Epithel wird im Zentrum der Wunde dünner und fragiler und ist manchmal nicht in der Lage, die ganze Wunde sicher abzudecken. Besonders zirkuläre Wunden weisen im Vergleich zu Defekten anderer Geometrie eine langsamere und schlechtere Kontraktion auf und die daraus resultierende Narbe ist kosmetisch oft weniger befriedigend (28-32).

Auf der anderen Seite kann die Wundkontraktion aber auch zu einer pathologischen Situation („Kontraktur“) führen. Diese schränkt die Mobilität des involvierten Hautbezirkes ein (vor allem über Gelenken und natürlichen Körperöffnungen) und kann zusätzlich schmerzhaft sein (27-29, 33-35). Eine zirkuläre Kontraktur um eine Gliedmasse kann einen Gefässstau bewirken und als Folge eine Ischämie verursachen (28).

Hinsichtlich der Wundkontraktion gibt es erhebliche Unterschiede zwischen den Spezies. Bei Nagetieren und Kaninchen („*loose skinned animals*“) verläuft die Wundheilung bis zu 90% über die Kontraktion (20, 22). Beim Menschen erfolgt die Wundheilung hauptsächlich durch Epithelisation und nur in 25-50% über eine Wundkontraktion (21, 23).

4.2.3. AKTUELLE WUNDBEHANDLUNG MIT WUNDAUFLAGEN

Wundauflagen haben zahlreiche Funktionen: Schutz und Débridement der Wunde, Aufrechterhaltung eines günstigen, feuchten Milieus, Zufuhr von pharmakologisch wirksamen Substanzen (z.B. Antiseptika, Kortikoide, Elektrolyte), Unterstützung der Koagulation, Hygiene und Schmerzreduktion (36).

Wundauflagen haben sich im Laufe der Jahre von Pflanzenextrakten, Tierfett und Honig zu den modernsten „tissue engineered scaffolds“ entwickelt. Wundauflagen werden aufgrund ihrer Funktion in der Wunde (Débridement, antibakteriell, okklusiv, absorbierend, adhäsiv usw.), ihrer Zusammensetzung (Hydrokolloid, Alginat, Kollagen usw.) und ihrer Struktur (Salbe, Film, Schaum, Gel) klassifiziert (37-39).

Wundverbände bestehen im Allgemeinen aus 3 Schichten: Der Primärschicht, der Sekundärschicht und der Tertiärschicht, von denen jede eine eigene Funktion hat (40).

Die primäre Schicht (Kontaktschicht) liegt der Wunde direkt auf. Sie nimmt Wundexsudat auf und leitet es zu den äusseren Schichten des Verbandes weiter (z.B. absorbierende Wundauflagen), sie hält die Feuchtigkeit an der Oberfläche der Wunde zurück (z.B. okklusive Wundauflagen) und sie ist ggf. auch in der Lage, mit der Wundflüssigkeit zu interagieren (z.B. Elektrolytaustausch), zum Beispiel indem sie sich durch den Kontakt mit der Wunde zu einem Gel verändert (interaktive Wundauflage) (36, 40).

Die sekundäre Schicht bedeckt die primäre und hat beispielsweise die Funktion, die aus der Primärschicht weitergeleitete Flüssigkeit aufzunehmen und festzuhalten (36, 40).

Die tertiäre, äusserste Schicht eines Verbandes dient zum Schutz der darunterliegenden Strukturen. Mit dieser Schicht kann, falls gewünscht, eine gewisse Kompression bewirkt werden, um Ödeme, Flüssigkeitsansammlungen und Toträume zu reduzieren (36, 40).

Während Verbände früher meist ausschliesslich absorbierend waren, haben heutige Wundauflagen überwiegend den Effekt, die Wunde feucht zu halten, da es nachgewiesen wurde, dass ein feuchtes Milieu die Migration von Epithelzellen und das autogene Wund - Débridement unterstützt und damit die Wundheilung erheblich beschleunigt (41). Im Verlauf der Heilung ändern sich die Anforderungen an die Wundauflage. Aus diesem Grund sollte die Wundauflage immer an die Wundheilungsphase angepasst und ggf. gewechselt werden. Dafür steht eine grosse Auswahl an verschiedenen Auflagen zur Verfügung, die den unterschiedlichen Bedürfnissen der heilenden Wunde gerecht werden.

Hydrogele werden häufig für das Débridement der Wunde eingesetzt (42). Diese Biomaterialien können zusätzlich die Aufrechterhaltung eines feuchten Wundmilieus gewährleisten, was positive Auswirkungen auf die Heilung hat (43). Hydrogele sind in der Lage, nekrotische Gewebe zu rehydrieren und Wundexsudat zu absorbieren (44). Man

unterscheidet zwei Formen von Hydrogelen: Die amorphen, weichen Hydrogele und die festen Hydrogele in Blattform (44,45).

Trotz ihres hohen Wassergehalts können Hydrogele ohne Änderung ihrer charakteristischen gelatinösen Form Wundflüssigkeit (mit Bakterien, Zellabfall, Fremdkörpern, Geruchsmolekülen) absorbieren (46). Manche Hydrogele verbleiben noch längere Zeit nach ihrer Applikation in nahezu unveränderter Form und Konsistenz in der Wunde. Dies kann zu einer geringeren Narbenbildung beitragen (47). Nachteil einiger amorpher Hydrogele ist ihr Gehalt an Propylenglykol, was zu allergischen Reaktionen beim Menschen führen kann (44, 48, 49). Beim zeitlich begrenzten Kontakt mit intakter Haut ist Propylenglykol harmlos und verursacht keine Irritationen (50), bei Langzeitbehandlungen können aber Kontaktdermatitis, Hautentzündungen, leichtgradige Hautirritationen und Allergien auftreten (51-53). Bei einigen Patienten traten sogar Hautmazerationen auf, dies ist aber vermutlich durch eine zu lange Behandlungsperiode oder durch die Auswahl eines unpassenden Sekundärverbandes verursacht worden (54). In der Humanmedizin werden Hydrogele bei infizierten Wunden, Verbrennungen und bei Wunden, die auf andere Wundauflagen oder andere Débridementtechniken nicht ansprechen, verwendet, (47, 50, 55-57).

4.3. HYDROGELE

4.3.1. ZUSAMMENSETZUNG UND FUNKTIONEN

▪Einleitung

Hydrogele sind 3-dimensionale polymerisierte Materialien, die durch einen sehr hohen Wassergehalt (20% bis 90%) gekennzeichnet sind und aus multiplen quervernetzten („crosslinking“) hydrophilen polymeren Ketten bestehen (2). Dank ihrer besonderen Eigenschaften werden sie in zahlreichen Disziplinen wie zum Beispiel der Medizin, der Biotechnologie, der Pharmaindustrie und der Nahrungsmittelindustrie verwendet.

Während der fünfziger Jahre haben die Pioniere Wichterle und Lim (58) im Rahmen der ophthalmologischen Forschung dieses Biomaterial erstmals hergestellt. Die erwünschten Eigenschaften des Materials waren: Eine weiche, verformbare, chemisch stabile Grundstruktur, die mit diversen wasserlöslichen Komponenten interagieren konnte. Es gelingt Wichterle und Lim 1953 die ersten Hydrogele mit einem quervernetzten Poly (2-hydroxyethyl) Methacrylat an einem Ethylen Dimethylacrylat zu synthetisieren. Ihre erfolgreiche Arbeit wurde 1960 in Nature publiziert (58). Wichterle entwickelte 1968 die ersten aus einem Hydrogel bestehenden flexiblen Kontaktlinsen (59). Ab diesem Zeitpunkt wurden diese neuen viel versprechenden Biomaterialien intensiv für die verschiedensten Anwendungen geprüft (60). 1980 haben Yannas et al. Kollagen und Fischknorpel in einem Hydrogel verbunden, was später als synthetische Wundauflage für Hautverbrennungen benutzt wurde (61). In der Folge wurden Hydrogele als potente Bioträger und Matrices vorwiegend für die generelle Gewebereparatur betrachtet und untersucht (3). In den letzten 20 Jahren hat sich die Technologie dieser Biomaterialien ständig weiter entwickelt und die Hydrogele sind heutzutage in sehr vielen Disziplinen (Krebsforschung, Stammzellforschung, Immunmodulation, in vitro Diagnostik und Geweberekonstruktionsforschung) als Biosensoren, als medizinische Implantate und als molekül- oder medikamenttragende Vektoren praktisch unersetzbar geworden (3, 62-65).

▪Synthese von Hydrogelen

Ein makromolekulares Gel ist eine polymerisierte Matrix, die als Reaktion auf die Zugabe eines Lösungsmittels an Volumen zunimmt, bei Hydrogelen ist dies Wasser. Die Grundstruktur besteht aus multiplen polymerisierten Ketten, die miteinander zu einem Netzwerk verbunden sind. Man unterscheidet zwei verschiedene Typen:

1. Die physikalisch vernetzten Gele, die durch nicht-kovalente Verbindungen verknüpft sind (Van der Waals, H+ Verbindungen) (66).
2. Die chemisch vernetzten Gele, bei denen die polymerisierten Ketten durch kovalente Verbindungen verknüpft sind (66).

Anhand einer chemischen oder physikalischen (siehe Tab. 4.3.1a) Quervernetzung werden initial wasserlösliche Polymere in ein wasserunlösliches Gel umgewandelt.

-physikalische Quervernetzung

Bei diesem Verfahren wird das Prinzip der hydrophoben Interaktionen benutzt, bei dem hydrophile und hydrophobe Blöcke ein amphiphiles Polymer bilden, zum Beispiel durch eine Temperaturerhöhung (siehe Tab 4.3.1a) (67).

-chemische Quervernetzung

Die kovalenten Verbindungen, die beim chemischen Vernetzen entstehen, sind insgesamt kräftiger als nicht-kovalente, deswegen sind chemisch verknüpfte Gele stabiler als physikalisch verknüpfte. Es gibt verschiedene Methoden der Herstellung, wie zum Beispiel radikale Polymerisation, chemische Reaktion der komplementären Gruppe, Bestrahlung oder der Einsatz von diversen Enzymen (siehe Tabelle 4.3.1a)(68).

Tabelle 4.3.1a: Häufig eingesetzte chemische und physikalische Methoden zur Hydrogel-Synthese (64)

Physikalische Methoden	Temperatur	pH	Mischung eines Polyanions mit einem Polykation	Gelbildung zwischen einer polyelektrolyten Lösung und einem multivalenten Ion
	Erhöhung beziehungsweise Erniedrigung	pH Variationen (H+ Verbindungen zwischen 2 Polymeren in einem flüssigen Milieu)		
Beispiele	Agarose oder Gelatine in Wasser	PEG und PAA	Natriumalginat und Polysine	Natriumalginat und Calcium
Chemische Methoden	Crosslinking von Polymeren	Copolymerization eines Monomeres mit einem Vernetzter in einer Lösung	Polymerisierung eines Monomeres in einem festen Polymer	Chemische Umwandlung eines hydrophoben Polymer in ein Hydrogel
	Bestrahlung Chemisches Crosslinking			
Beispiele	Bestrahlung von PEG in Wasser Kollagen mit Glutaraldehyd	HEMA+EGDMA	Akrylnitril und Stärke	Partielle Hydrolyse von PVAc zu PVA

Je nach Inhaltsstoffen und Herstellungsverfahren weisen die Hydrogele unterschiedliche Eigenschaften auf, die sie für verschiedene Einsatzbereiche geeignet machen (siehe Tabelle 4.3.1b)

Tabelle 4.3.1b: Hydrogele: Zusammensetzung und Eigenschaften (64, 69, 70)

Makromolekuläre Struktur	<ul style="list-style-type: none"> - retikuläres Netzwerk aus linearen Homopolymeren oder Copolymeren oder aus verzweigten Polymeren - polyionisierter Komplex - hydrophiles Netzwerk, stabilisiert durch hydrophobe Regionen - physikalische Mischungen
Physikalische Struktur und Form	<ul style="list-style-type: none"> - flüssig (mit der Möglichkeit zur Gelbildung durch gezielte Temperaturänderung) - weicher Festkörper (z.B. Kontaklinse) - komprimiertes Pulver (Kapsel oder Tablette für die orale Aufnahme) - Mikropartikel (bioadhäsive Vektoren) - Beschichtung (auf Implantaten, Kapseln oder Tabletten) - Membran (transkutaner Patch, Elektrophorese Gel)
Bestandteile	<ul style="list-style-type: none"> - synthetisch - natürlich - hybrid
Natur des polymerisierten Netzwerkes	<ul style="list-style-type: none"> - chemisch - physikalisch
Ladung	<ul style="list-style-type: none"> - kationisch - anionisch - neutral - amphoter
Reaktivität mit der Umgebung	<ul style="list-style-type: none"> - stimulussensitiv - nicht stimulussensitiv
Biodegradation	<ul style="list-style-type: none"> - abbaubar - nicht abbaubar

In der Hydrogel-Herstellung werden sowohl natürliche als auch synthetische Materialien eingesetzt (siehe Tabelle 4.3.1c).

Tabelle 4.3.1c: Häufig in der Hydrogel-Herstellung eingesetzte natürliche Polymere und synthetische Monomere (64, 71)

Natürliche Polymere			
Anionische Polymere	Kationische Polymere	Amphiphile Polymere	Neutrale Polymere
<ul style="list-style-type: none"> - Hyaluronsäure - Alginat - Pectine 	Chitosan	<ul style="list-style-type: none"> - Kollagen - Fibrin - Gelatine 	<ul style="list-style-type: none"> - Dextran - Agarose
Synthetische Monomere			
Hydroxyethyl methacrylat (HEMA)			
N-(2-Hydroxypropyl) methacrylat (HPMA)			
N-Vinyl-2-Pyrrolidon (NVP)			
N-Isopropyl Akrylamid (NIPAAm)			
Vinylacetat (VAc)			
Acrylsäure (AA)			
Ethylenglykolacrylat/methacrylat (EGA/EGMA)			
Ethylenglykoldiacrylat/dimethylacrylat (EGDA/EGDMA)			

▪ *Strukturen und Eigenschaften von Hydrogelen*

Die genaue Kenntnis über die Charakteristika eines Hydrogels und die Möglichkeit, es gezielt zu modulieren sind Voraussetzungen für dessen optimalen Einsatz. Deshalb wird bei der Herstellung eines Hydrogels die generelle Struktur an die erwünschte oder geplante Funktion angepasst.

Unterscheidungsmerkmale der verschiedenen, in der Medizin angewendeten Hydrogele beziehen sich auf ihre Biokompatibilität, Biodegradation, Bioadhäsion, Bioaktivität (Interaktionen mit den umliegenden Geweben), Transportfähigkeit (mit der entsprechenden Abgabe von bioaktiven Molekülen) und mechanischen Eigenschaften. Bei einigen Hydrogelen („intelligente Hydrogele“) besteht die Möglichkeit, deren Struktur oder Eigenschaften nach der Applikation durch externe Stimuli abzuändern.

-Die **Biokompatibilität**

Ein Material gilt als biokompatibel, wenn es nach seiner Implantation im Gewebe keine Reaktionen hervorruft, die über die zur Resorption des Materials nötigen hinausgehen. Im Allgemeinen werden die aus natürlichen Bestandteilen hergestellten Polymere besser toleriert (72) als diejenigen, die synthetische Komponenten enthalten.

-Die **Biodegradation**

Unter dem Begriff der Biodegradation eines Hydrogels versteht man dessen Abbau in vivo durch Hydrolyse oder Proteolyse. Im Idealfall werden durch die Degradation bioaktive Substanzen freigesetzt, welche die Heilung des Gewebes beschleunigen und der Abbau läuft parallel mit einem gleichzeitigen Aufbau von körpereigenem Gewebe (2). Um die Biodegradation eines Hydrogels zu kontrollieren, stehen verschiedene chemische oder physikalische Methoden zur Verfügung, zum Beispiel indem man die molekulare Masse oder die Zusammensetzung der Polymere verändert. Bei der zellmedierten Biodegradation (durch aktivierte Neutrophile und Makrophagen, Epithelzellen, Fibroblasten und Endothelzellen) werden bestimmte Enzyme (Kollagenase, Matrix-Metalloproteinase, Gelatinase) eingesetzt, die spezifisch den Abbau der dazugehörenden Oligomere, (die mit crosslinking mit den polymerisierten Ketten verknüpft sind) einleiten (73-76). Dieser Mechanismus hat den Vorteil, dass die Degradation in einer physiologischeren Weise abläuft. Die Hydrogele, die aus natürlichen Polymeren bestehen, weisen eine bessere Biodegradation auf als dies bei synthetischen Polymeren der Fall ist. Der Ablauf ihres Abbaus ist jedoch viel weniger kontrollierbar als bei den synthetischen Polymeren.

-Die **Bioadhäsion**

Unter Bioadhäsion versteht man den engen Kontakt zwischen dem implantierten Hydrogel und den lokalen zellulären Komponenten, was Interaktionen zwischen beiden Milieus ermöglicht. Im Gegensatz zu anderen natürlichen Proteinen besitzen beispielsweise Fibrin und Kollagen adhäsive Eigenschaften (2). Der gezielte Einsatz von spezifischen Molekülen (Grundsubstanz des Hydrogels), welche adhäsive Eigenschaften aufweisen, erlaubt diesen engen Kontakt mit der Umgebung. Dazu gehört z.B. die „Fibronectin's central cell-binding Domaine“ (FN III 9-10) (77), die vorwiegend in der Knochenreparation (77) und in der axonalen Regeneration zum Einsatz kommt (78).

-Die Bioaktivität

Ein Hydrogel wird bioaktiv genannt, wenn es gewisse biologische Prozesse wie z.B. lokale Morphogenese, Zellrekrutierung und kontrollierte Zelldifferenzierung induzieren, beschleunigen oder verstärken kann, etwa durch die Freisetzung von spezifischen Wachstumsfaktoren (79).

-Der Transport

Hydrogele können als Transportvehikel eingesetzt werden, zum Beispiel in der Chemotherapie. Bei ihrem Abbau können therapeutische Substanzen präzise in die Umgebung der Tumorzellen abgegeben werden (2).

-Die mechanischen Eigenschaften

Die mechanischen Eigenschaften eines Hydrogels sind für die jeweilige spezifische Anwendung von grosser Bedeutung. Je nach Einsatzort muss das Gel weich (Kontaktlinse) oder fest (Feuchtigkeitsabsorbierende Mikrokügelchen) sein. Der Festigkeitsgrad ist von den polymerisierten Ketten, von dem eigentlichen Crosslinking, der Art der Moleküle und ihrer Dichte abhängig. Der Schwellungsgrad hat zudem Auswirkungen auf die generellen mechanischen Eigenschaften: Je mehr Wasser das Hydrogel enthält, desto geringer ist die Vernetzungsdichte, was den mechanischen Widerstand reduziert (70, 80, 81). Die Festigkeit des Hydrogels kann durch verschiedene chemische Prozesse erhöht werden (z.B. Änderung der Zusammensetzung, Zunahme der Vernetzungsdichte, Änderung des Milieus (70, 80, 81).

▪Das „intelligente“ Hydrogel

Physikalische (Licht, Temperatur, Druck, magnetisches Feld, Ultraschall) beziehungsweise (bio)chemische Stimuli (pH, Enzyme, Antigene, Glukose) können bei sogenannten „intelligenten Hydrogelen“ entweder die Interaktionen zwischen den polymerisierten Ketten oder zwischen dem Polymer und dem Lösungsmittel ändern und damit intrinsische strukturelle oder funktionelle Änderungen des Hydrogels bewirken, zum Beispiel den Schwellungsgrad, den mechanischen Widerstand und die Durchlässigkeit (69).

Biochemisch beeinflussbare Hydrogele wurden beispielsweise für die Anwendung bei Diabetes entwickelt. Glukose-sensitive Hydrogele können hierbei die Abgabe von Insulin dem aktuellen Blutglukosespiegel des Patienten anpassen (69).

4.3.2. ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN DER HYDROGELE

▪ *Kontrollierte Freisetzung von Medikamenten oder bioaktiven Substanzen*

Hydrogele gelten in der pharmazeutischen Industrie als wertvolle bioaktive Substanzenträger und -freisetzer. Der Ablauf des Abbauvorgangs ist ein wichtiger Punkt für die jeweilige Medikamentenfreisetzung und für den Therapieerfolg (71). Ein gutes Beispiel sind pH-sensitive Hydrogele, welche für die orale Aufnahme bestimmt sind. Der Schwellungsgrad dieser Hydrogele wird vom pH des Milieus, in dem sie sich finden, beeinflusst. Im Rahmen der Diabetes mellitus Therapie erfolgt im basischen Milieu eine Volumenzunahme des Gels durch Ionisierung und damit eine Freisetzung der therapeutischen Substanz (Insulin) (70, 82).

▪ *Zelluläre Immobilisierung*

Hydrogele werden in der Medizin und Biotechnologie auch für die sogenannte zelluläre Immobilisierung verwendet. Sie sind in der Lage, aufgrund ihrer chemischen oder physikalischen Eigenschaften Zellen zu immobilisieren um z.B. eine zelluläre Stabilität, Immunoisolierung und strukturelle Matrix anzubieten bzw. gewährleisten zu können (63). Für die Immobilisierung von Zellen in einem Hydrogel gibt es verschiedene Möglichkeiten: Die Adhäsion, die Mikroverkapselung und der „Zellenfang“ („matrix entrapment“).

Die *Adhäsionstechnik* beruht auf der Adhäsion von Zellen am Hydrogel. Diese Technik setzt gute bioadhäsive Eigenschaften des Hydrogels voraus, diese kann man verbessern, indem man zusätzliche adhäsive Proteine oder Oligopeptide einführt (wie z.B. Arginin-Glycin-Asparaginsäure) (83). Diese Technik wird vor allem bei der Zellkulturstabilisierung oder für Analyseverfahren verwendet. Sie wird bei der Herstellung einer strukturellen Matrix für wachsende oder sich differenzierte Zellen verwendet (63).

Bei der *Mikroverkapselung* werden einzelne Zellen oder ein Zellkonglomerat in einer porösen und semipermeablen Membran eingeschlossen. Diese Mikroverkapselung hat den grossen Vorteil, dass das Gel für die Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr permeabel ist, gleichzeitig aber den Eintritt von Immunzellen verhindert. Als Beispiel kann die Zelltransplantation genannt werden. Hier behalten die „eingesperrten“ Zellen ihre Funktionalität (z.B. Sekretion von Hormonen und Proteinen im Rahmen der Therapie von Diabetes mellitus (63), Morbus Parkinson (84) und der Leberinsuffizienz (85), sind aber vor dem Immunsystem des Patienten geschützt (63).

Mit dem „*Zellenfangverfahren*“ („matrix entrapment“) werden die Zellen mechanisch am Abwandern gehindert. Dieses Verfahren wird manchmal als Makroverkapselung bezeichnet, wenn das Hydrogel die immobilisierten Zellen isoliert und sie so vor dem Immunsystem schützt (63). Das poröse Netzwerk des Hydrogels wirkt als physikalische Barriere, ermöglicht aber die Nährstoffversorgung. Im Rahmen des Gewebe-Engineering stellen Hydrogele die Matrices für die immobilisierten Zellen, zum Beispiel Collagen-entrappt Hepatozyten im Rahmen einer Lebertransplantation (86, 87).

▪ *Gewebe Engineering*

Beim Gewebeengineering dient eine synthetische, 3-dimensionale polymerisierte Matrix als extrazelluläre Substanz, in die Patientenzellen eingebaut werden können. Im Rahmen der Wundheilung dient dieses Konstrukt als ein Gerüst für die Zelleinwanderung. Spezifische Substanzen oder Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren) können mit eingebracht werden, welche lokal die Wundheilung fördern (3). Der hohe Wassergehalt des Hydrogels gewährleistet den enthaltenen Substanzen (Zellen, Medikamenten, Proteine, DNA usw.) ein schützendes Milieu. Zudem dient das enthaltene Wasser als Träger für Nährstoffe und Zellprodukte. Ein Vorteil der flüssigen Form ist die Injizierbarkeit und die nachfolgende Umwandlung in ein Gel durch chemische oder physikalische Einflüsse (64). Nachteile sind das schwierige Handling, die schwierige Sterilisation und die schwachen mechanischen Eigenschaften (64, 80).

▪ *PEG-Fibrinogen Hydrogel*

Das in dieser Studie untersuchte Hydrogel bestand aus der Kombination eines synthetischen linearen Polyethylen (glykol)-diacrylat mit Fibrinogen. Durch die Kombination der beiden Substanzen konnten die Vorteile beider Komponenten ausgenutzt werden (88-90). Hauptvorteile von PEGylierten natürlichen Proteinen sind deren strukturelle Eigenschaften und die mechanische Stabilität des synthetischen PEGs, kombiniert mit der Biokompatibilität und Bioaktivität des Fibrinogens (6, 9, 10, 15, 91-94). Biomaterialien aus Fibrinogen können durch biologische Signale die zelluläre Remodelierung anregen (94) und die Migration, Adhäsion und Differenzierung von endothelialen und glatten Muskelzellen steuern (6, 95). Sowohl in vivo bei verschiedenen Zelltypen, (91, 94) in Herz (16, 17) Muskel (18) und Knochen (15) als auch in vitro, (6, 9-14) konnte gezeigt werden, dass PEG-Fibrinogen biokompatibel und nicht zytotoxisch ist. Das Material ist bisher noch nicht im Bereich der Heilung von Hautwunden getestet worden. In den anderen in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass das PEG-Fibrinogen Hydrogel die Expression von Aktin und Matrix Metalloproteinasen nicht beeinträchtigt (96). Diese Expression ist eng mit der Zellmorphogenese verbunden. Ein weiterer Vorteil des Hydrogels ist sein hoher Wassergehalt, der die Wunde feucht hält und damit einen positiven Einfluss auf die Heilung haben kann. Das Hydrogel ist bei Applikation flüssig, dies erlaubt eine homogene Integration in den Gewebedefekt. Die Umwandlung in eine Gelform wird durch die beigemischten Photoinitiatoren und die Bestrahlung mit UV-Licht erreicht (15, 96, 97).

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1. HYDROGEL

Das Hydrogel wurde direkt vor der Applikation lichtgeschützt angemischt. Es bestand aus linearem Polyethylenglykol hydroxyl PEG-OH (MW 10 kDa; Fluka, Buchs, Schweiz), was schlussendlich Polyethylenglykol Diacrylat PEG-DA bildete. Die Synthese von PEG-DA war gemäss bereits bestehender Protokolle durchgeführt worden (6): Die Akrylierung von PEG-OH wurde unter Reaktion einer PEG-OH Dichloromethan Lösung (DCM) (Aldrich, Sneeze, Deutschland) zusammen mit Akryloylchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Triethylamin (Fluka, Buchs, Schweiz) eingeleitet, im Molverhältnis von 150% zu den -OH Gruppen. Anschliessend wurde dieses Produkt in Diethylether zur Ausscheidung gebracht und unter Vakuum während 48 Stunden abgetrocknet.

Die PEGylierung des humanen Fibrinogens (Tisseel, Baxter AG, Wien, Österreich) wurde gemäss dem von Dikovskiy beschriebenen Protokoll durchgeführt (91). Tris(2-carboxyethyl)Phosphin Hydrochloride (TCEP HCL) (Sigma, Steinheim, Deutschland) wurde zu einer 3,5mg/ml Fibrinogenlösung in 50mM PBS mit 8M Harnstoff (Molarverhältnis 1.5:1 TCEP HCL zu Fibrinogen Cysteine) gegeben und mit Polyethylenglykol (PEG) chemisch verbunden. Zu einer 7 mg/ml Fibrinogen-Lösung (50 mM PBS mit 8 M Harnstoff (molekulares Verhältnis 68:1 TCEP zu Fibrinogen-Cystein) wurde Tris-(2-carboxylethyl)-Phosphin-Hydrochlorid (TCEP HCL) (Sigma, Steinheim, Deutschland) hinzugefügt.

Das Molverhältnis von PEG zu Fibrinogen-Cystein war 5:1 (lineares PEG-DA, 6- und 10 kDa). Durch Hinzufügen von 4 Acetonvolumen (Frutamon, Haifa, Israel) wurde das PEGylierte Protein ausgefällt. Das Präzipitat wurde dann wieder in PBS aufgelöst, das 8M Harnstoff enthielt, sodass dann eine Proteinkonzentration von 10mg/ml vorlag. Anschliessend wurde die Lösung gegen 50mM PBS dialysiert. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde unter Anwendung von Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bestimmt. Die rheologischen Eigenschaften und der Substitutionsgrad des PEGs wurden entsprechend vorheriger Studien ermittelt (15, 91).

Die iatrogenen Wunden wurden mit „hydrogel precursor solution“ gefüllt. Diese Lösung bestand aus: 4.7% (w/v) PEG-DA, 0.7% (w/v) PEGylated Fibrinogen und 0.1% (w/v) Irgacure ®2959 Photoinitiator Solution (Ciba Speciality Chemicals, Basel, Schweiz). Diese „ready to use“ Flüssigkeit des PEG-Fibrinogen wurde nach der Applikation in die Wunde vernetzt, indem sie 5 Minuten lang von einer UV Lampe ($\lambda = 365 \text{ nm}$, $I = 5 \text{ m W/cm}^2$) bestrahlt wurde. Am Ende der Bestrahlung war die flüssige „hydrogel precursor solution“ geliert (siehe Abbildungen 1, 3-5).

5.2. IN VIVO STUDIE

5.2.1. VERSUCHSTIERE

Für die Studie wurden 6 Ratten aus einer anerkannten Versuchstierzucht (Fa Harlan Nederland, NL-5961 NM Horst, Nederland) verwendet. Alle Ratten waren weiblich und gehörten dem Stamm Sprague Dawley an. Am Ankunftsstag hatten sie ein Körpergewicht von 168 bis 180 Gramm (Mittelwert $173.5 \pm 5.28 \text{ g}$). Sie waren vom Züchter auf diverse relevante pathogene Keime (Bakterien, Viren, Ekto- und Endoparasiten) negativ getestet worden. Alle Tiere wurden klinisch untersucht, dabei konnten keine Auffälligkeiten beobachtet werden

(Kriterien: Aktivität/Verhalten, Körpergewicht, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Appetit, Kotabsatz). Die Tiere wurden durch Schwanzmarkierungen mit wasserfestem Stift individuell gekennzeichnet und dann in 2 Gruppen mit jeweils 3 Tieren in Individually Ventilated Cages (IVC, Grösse 590 mm x 380 mm x 200mm, Techniplast, Hohenpeissenberg, Deutschland) eingeteilt. Die Versuchstiere wurden im Biologischen Zentrallabor des Universitätsspitals Zürich (Institut für Labortierkunde, 8090 Zürich, Schweiz) gehalten.

Die Studie wurde vom kantonalen Veterinäramt bewilligt (Bewilligungsnummer 150/2013). Alle Versuche entsprachen den geltenden Bestimmungen des Schweizer Tierschutzgesetzes.

Die Käfige enthielten Holzspäne als Einstreu, sowie einen Lauftunnel und Heu als Beschäftigungsmaterial. Die Ratten wurden mit einem Standardfutter für Nagetiere ernährt (Extrudat Maus und Ratte 3436, Kliba Nafag, Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Schweiz) und erhielten frisches entkeimtes Wasser (ProMinent Leitungswasser von Zürich Stadt) *ad libitum*. Die Akklimationsphase vor der Operation dauerte 14 Tage. Während dieser Periode wurden die Ratten täglich manipuliert, um ihr Vertrauen zu gewinnen und um die später folgende Behandlung stressfreier durchführen zu können. Dabei wurde das Allgemeinbefinden der Tiere überprüft. Folgende Parameter wurden evaluiert: Aufmerksamkeit, Körperhaltung, Appetit, Atmung, Schmerzzeichen, Lahmheit. Zudem wurden sie auf Anzeichen für Stress (z.B. Porphyrin Augenausfluss oder struppiges Fell) sowie für Beissereien untereinander hin untersucht.

5.2.2. AUFBAU DER IN VIVO STUDIE

Die Ratten wurden narkotisiert und im Rückenbereich wurden 4 Hautwunden standardisierter Grösse (vorne links, vorne rechts, hinten links, hinten rechts) gesetzt (siehe Abbildung 2). Die Wunden wurden randomisiert in Hydrogel-behandelte oder unbehandelte Kontrollwunden unterteilt. (siehe Tabelle 5.2.2.a,b). Die Tiere überlebten 7 Tage (n=3) bzw. 14 Tage (n=3). In der 14-Tages-Gruppe wurde nach 7 Tagen in Narkose ein Verbandswechsel durchgeführt, dabei wurde der Heilungsverlauf fotografisch dokumentiert. (siehe Abbildungen 8-12).

Tabelle 5.2.2.a: Schema der Wundbehandlung (7-Tages-Gruppe)

	vorne links	vorne rechts	hinten links	hinten rechts
Ratte 43.01	PEG-Fibrinogen Hydrogel	ohne Behandlung	ohne Behandlung	PEG-Fibrinogen Hydrogel
Ratte 43.02	ohne Behandlung	PEG-Fibrinogen Hydrogel	PEG-Fibrinogen Hydrogel	ohne Behandlung
Ratte 43.03	PEG-Fibrinogen Hydrogel	ohne Behandlung	ohne Behandlung	PEG-Fibrinogen Hydrogel

Tabelle 5.2.2.b: Schema der Wundbehandlung (14-Tages-Gruppe)

	vorne links	vorne rechts	hinten links	hinten rechts
Ratte 43.04	PEG-Fibrinogen Hydrogel	ohne Behandlung	ohne Behandlung	PEG-Fibrinogen Hydrogel
Ratte 43.05	ohne Behandlung	PEG-Fibrinogen Hydrogel	PEG-Fibrinogen Hydrogel	ohne Behandlung
Ratte 43.06	PEG-Fibrinogen Hydrogel	ohne Behandlung	ohne Behandlung	PEG-Fibrinogen Hydrogel

5.2.3. OPERATION

Vor dem operativen Eingriff erfolgten eine allgemeine Untersuchung und ein erneutes Wiegen. (Gewicht der Tiere 214 – 220g, Mittelwert 217.33 +/- 2.73g). Die Ratten wurden in einer Anästhesiekammer mit einem Isofluran-Sauerstoffgemisch narkotisiert. Der Sauerstofffluss betrug 0.7 Liter pro Minute mit einer Isoflurankonzentration von 2.5-5 Vol% (Attane™ Isoflurane ad us. vet., Provect AG, Lyssach, Schweiz). Nach der erfolgreichen Anästhesieeinleitung (Wegfall des Stellreflexes) wurden die Tiere aus der Anästhesiekammer genommen, mit Ketamin (20mg/kg Körpergewicht (KGW) s.c., Ketonarkon 100 ad us. vet. Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) analgetisch versorgt und erhielten zur Fortführung der Narkose über eine Maske ein Sauerstoff-Isoflurangemisch (0.7 l Sauerstoff/min mit 2.5 Vol% Isofluran). Um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern, wurde eine Augensalbe (Vitamin A Augensalbe, Bausch&Lomb Swiss AG, Steinhausen, Schweiz) verabreicht. Danach wurde ein Chip (Datamars PetLink™ DATAMARS SA, Bedano-Lugano, Schweiz) an der linken Halsseite implantiert, um die Tiere unverwechselbar zu kennzeichnen.

Das Operationsfeld wurde dorsal vom Nacken bis zum Lumbalbereich geschoren und aseptisch vorbereitet (Kodan® Tinktur forte, Schülke&Mayr AG, Zürich, Schweiz), dann wurden die Ratten in Bauchlage auf einer Wärmeplatte auf dem Operationstisch positioniert, steril abgedeckt und nochmals mit einem Aseptikum eingesprüht. Die Narkose wurde mit Isofluran (2.5 Vol%) und Sauerstoff (0.7 Liter flow pro Minute) mittels einer Maske aufrechterhalten. Die Narkosetiefe wurde kontinuierlich überwacht. Beginn und Ende des Eingriffs wurden notiert, sodass die Operationsdauer errechnet werden konnte. Zur Standardisierung der Lage der Hautdefekte wurde eine Schablone verwendet (siehe Abbildung 2). Mit deren Hilfe wurden jeweils vier Defekte von 8 mm Durchmesser gesetzt, die alle Hautschichten umfassten. Zum Setzen der Biopsien wurden Hautstanzen verwendet (Biopsy Punch, ø 8 mm, Stiefel Laboratories SRL, Milano, Italien). Dies ergab eine Biopsiegrösse von ca. 50 mm². Auftretende Blutungen wurden durch leichten Druck mit Tupfern kontrolliert. Anhand eines randomisiertem Verteilungsschemas (siehe Tabelle 5.2.2a, b) wurden je 2 Wunden pro Tier mit Hydrogel behandelt, die anderen beiden blieben unbehandelt und galten als Kontrollwunden.

Das flüssige Hydrogel wurde mit einer 1 ml Spritze auf den Hautdefekt aufgetragen. Durch eine 3-minütige Bestrahlung mit einer UV-Lampe polymerisierte das flüssige Hydrogel zur Gelform. Alle Wunden wurden fotografiert (Nikon® D 5000).

5.2.4. POSTOPERATIVES MANAGEMENT

Die Wunden wurden durch Anlegen eines Verbandes vor Austrocknung und vor dem Benagen durch die anderen Tiere geschützt. Die Kontaktschicht bestand aus Urgocell® Lite (Urgo GmbH, Sulzbach, Deutschland), einer dünnen, absorbierenden und nicht okklusiven Schaumstoffwundauflage. Diese wurde mit dem synthetischen, nicht resorbierbaren, pseudo-monofilen Nahtmaterial Supramid® 4-0 (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) an der Haut fixiert. Die äusserste Schicht des Verbandes bestand aus einem Klebeverband mit Leukoplast® (BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) (siehe Abbildungen 6 und 7).

Danach wurden die Tiere in vorgewärmte Aufwachboxen verbracht. Während der Aufwachphase wurde der Sitz des Verbandes kontrolliert und falls nötig angepasst. Postoperativ standen den Ratten frisches Wasser gemischt mit einer sterilen Glukoselösung (Glucose 5% Fresenius-Infusionslösung, Fresenius Kabi AG, Oberdorf, Schweiz) und Standardfutter zur Verfügung.

Alle Tiere wurden am ersten Tag postoperativ mit Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz, 0.075mg/kg Körpergewicht (KGW) subkutan) analgetisch versorgt. Anschliessend wurde Buprenorphin zwei weitere Tage über das Trinkwasser (0.6mg/250ml Wasser, Temgesic[®], Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) verabreicht.

Bis zum Tag der Euthanasie wurden die Ratten zweimal täglich klinisch untersucht sowie der Sitz des Verbandes kontrolliert. Bei 2 Tieren (43.01 und 43.03) war am ersten beziehungsweise zweiten Tag postoperativ ein kompletter Verbandswechsel notwendig, da die Verbände stark beschädigt waren. Diese Verbandwechsel wurden in Narkose (siehe oben) durchgeführt. Anschliessend wurden beide Tiere allein gehalten, um ein erneutes gegenseitiges Benagen des Verbandes zu vermeiden.

Das Gewicht aller Tiere wurde initial am Operationstag, dann täglich für 4 weitere Tage (7-Tages und 14-Tages-Gruppe) und danach wöchentlich (14-Tages-Gruppe) ermittelt.

7 Tage nach der Operation wurde bei den Tieren der 14-Tages-Gruppe unter Vollnarkose (siehe oben) ein Verbandwechsel vorgenommen und die Wunden wurden makroskopisch hinsichtlich Sekretion, Schwellung und Rötung begutachtet. Alle Wunden wurden fotografiert. Dazu wurde die Kamera (Nikon Digital Camera D 5000) mit einem Abstandhalter versehen, in dessen Bildausschnitt ein Massstab integriert war. Auf diese Weise konnte gewährleistet werden, dass der Abstand zwischen den Wunden und der Kamera immer gleich war und die Grösse der Wunden damit an den Fotos verglichen werden konnten.

Die Tiere der 7-Tages-Gruppe wurden 7 Tage, die Tiere der 14-Tages-Gruppe 14 Tage postoperativ euthanasiert. Am Euthanasietag wurden die Hautproben entnommen.

5.2.5. EUTHANASIE

Die Tiere wurden in einer Anästhesiekammer mit Kohlendioxid narkotisiert und mit einer intrakardialen Injektion von 2ml Pentobarbital (Esconarkon ad us. vet, Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) euthanasiert.

5.3. PROBENGEWINNUNG UND -AUFARBEITUNG

Zur Probenentnahme wurden die euthanasierten Tiere in Bauch-Brustlage positioniert und die Schutzverbände entfernt. Die Wunden und die Innenseite der Verbände wurden fotografiert. Die Biopsien wurden mit einem ca. 3 mm breiten Rand gesunder Haut mit Hilfe eines Skalpell aus der Rückenhaut exzidiert, sodass jeder einzelne Quadrant jeweils eine Wunde enthielt. Die Hautstücke wurden dann mittels vier 25 G Kanülen (Terumo[®] Deutschland GmbH, Spreitenbach, Schweiz) auf kleine Styropor[®] (BASF AG, Zürich, Schweiz) Blöcke aufgespannt, um ein Einrollen während der Fixierung zu vermeiden. Jeder Defekt wurde makroskopisch beurteilt und fotografiert. Danach wurden die Proben für 24 Stunden in 4%iger gepufferter Formalinlösung fixiert und anschliessend in der Mitte der Wunde senkrecht zur Hautoberfläche halbiert, sodass die Mitte der Wunde den Bereich der anzufertigenden histologischen Schnitte darstellte.

Die Proben wurden nach dem Zuschneiden in Einbettkassetten verbracht, und so weiter verarbeitet. Zunächst wurden sie für 24 Stunden in eine Entwässerungsmaschine (Tissue-Tek[®]Vip[™], Digitana AG, Horgen, Schweiz) überführt. Nach der Entwässerung erfolgte die Einbettung in Paraffin und das Anfertigen von 3µm dicken Schnitten (Rotationsmikrotom HM355S, Mikrom International GmbH, Walldorf, Deutschland). Anschliessend erfolgte eine

Hämatoxilin-Eosin- (HE), und eine Masson-Färbung. Anschliessend wurden weitere Schnitte zusätzlich immunhistologisch gefärbt, mit dem Ziel, die α -SMA (alpha smooth muscle actin) Expression immunhistologisch darstellen zu können. α -SMA ist ein spezielles Protein, welches als Marker für den Nachweis von Myofibroblastenproliferation genutzt wird. Die immunhistologische Darstellung erfolgt dabei durch eine indirekte Immunperoxidase-Reaktion. Dazu wurden die Schnitte über Nacht bei 37°C getrocknet und wie folgt entparaffiniert: Zuerst wurden sie zweimal während 5 Minuten in Xylol getaucht und danach in verschiedenen Ethanolkonzentrationen (100% und 96%) jeweils zweimal und einmal in 70% eingetaucht. Im Anschluss wurden die Präparate dreimal ins Wasser geschwenkt. Als nächster Schritt erfolgte für 2 Minuten eine Gegenfärbung mit Hämalaun und ein abschliessendes Wässern. Die Schnitte wurden dann in ein Immunhistochamber (Sequenza) eingespannt. Die endogene Peroxidase wurde durch den Zusatz von 3% H₂O₂ + 0.2% NaN₃ in entionisiertem Wasser während 10 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden anschliessend mit einer „blocking solution“ für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Blockierung der Unspezifität, Protein-Block Serumfree (Dako Protein-Block Serum Free X0909). Die Inkubation mit dem primären Antikörper Mouse-anti-Human alpha Smooth Muscle Actin (α -SMA) Clone 1A4 (DAKO, N1584) erfolgte bei Raumtemperatur über eine Stunde. Anschliessend wurde die Inkubation mit EnVision Polymer-Peroxidase, anti-Mouse EnVision System (Dako EnVision System-HRP Labelled Polymer anti-Mouse K4001) während 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Schliesslich wurden die Präparate aus dem Immunhistochamber (Sequenza) ausgespannt und in PBS gestellt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit einem AEC Substrat (Novex by Life Technologies, AEC (red) Substrate KIT, Invitrogen 002007) während 10-20 Minuten unter mikroskopischer Kontrolle entwickelt. Als letzter Schritt erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Glycerin-Gelatine (Kaisers Glycingelatine Merck 1.09242.0100).

5.4. UNTERSUCHUNGSMETHODEN UND PROBENAUSWERTUNG

5.4.1. MAKROSKOPISCHE AUSWERTUNG, WUNDHEILUNGSVERLAUF

Die Wunden wurden am Operationstag, am 7. Tag (Euthanasie der Tiere der 7-Tages-Gruppe bzw. Verbandswechsel der Tiere der 14-Tages-Gruppe) und am 14.Tag (Euthanasie der Tiere der 14-Tages-Gruppe) makroskopisch beurteilt und fotografiert (siehe Abbildungen 8-12). Dabei wurden Wundgrösse („in Granulation“, „fast geschlossen“, „verheilt“) und Sekretion abgeschätzt und beurteilt.

5.4.2. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

5.4.2.1. SEMIQUANTITATIVE EVALUATION

Die HE-gefärbten Präparate wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Leica DMR, Leica Mikrosystems, Wetzlar GmbH, Deutschland) einer Digitalkamera (Leica DFC 320) und der entsprechenden Software (Image Access 10 Standard, Imagic, Bildverarbeitung, AG, Glattburg, Schweiz) in den Computer eingelesen. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte verblindet durch 3 Personen. Für die histologische Auswertung standen insgesamt 24 Schnitte zur Verfügung, 12 von Wunden, die mit Hydrogel behandelt worden waren und 12 von unbehandelten Kontrollwunden. Die Auswertungen wurden jeweils in der Mitte und am Rand der im histologischen Schnitt sichtbaren Wunde durchgeführt.

Folgende Parameter wurden mit Hilfe eines Scoresystems bewertet: Anzahl von Entzündungszellen, (Granulozyten, Makrophagen, Mehrkernige Riesenzellen, Lymphozyten), Materialreste (in Prozent der ursprünglichen Hydrogelmenge), Anzahl von angeschnittenen Gefäßen, Reife des Bindegewebes, Anwesenheit einer Basalmembran und Sichtbarkeit von Haarfollikeln (Scoresystem siehe Tabellen 5.4.2.1 a-f). Die Auswertung erfolgte jeweils in einem Gesichtsfeld bei einer 200-fachen Vergrößerung.

Tabelle 5.4.2.1a: Beurteilungsschema für Hydrogelreste in der Wunde (histologischer Schnitt, Vergrößerung 200x)

Prozent Materialrest (relativ zur eingebrachten Menge)	Score
0%	0
bis 25%	1
bis 50%	2
bis 100%	3

Tabelle 5.4.2.1b: Beurteilungsschema für die Anzahl von Immunzellen (Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen und Mehrkernige Riesenzellen, histologischer Schnitt, Anzahl pro Gesichtsfeld, Vergrößerung 200x)

Anzahl Immunzellen	Score
0	0
< 10	1
11-30	2
31-60	3
>60	4

Tabelle 5.4.2.1c: Beurteilungsschema für die Anzahl von Blutgefäßen (histologischer Schnitt, Anzahl pro Gesichtsfeld, Vergrößerung 200x)

Anzahl Blutgefäße	Score
0	0
1-5	1
6-10	2
>10	3

Tabelle 5.4.2.1d: Beurteilungsschema für die Reife des Bindegewebes (histologischer Schnitt, Vergrößerung 200x)

Reife des Bindegewebes	Score
unreif	0
teilweise unreif	1
mehrheitlich reif	2
voll ausgereift	3

Tabelle 5.4.2.1e: Beurteilungsschema für das Vorhandensein einer Basalmembran (histologischer Schnitt, Vergrößerung 200x)

Vorhandensein einer Basalmembran	Score
nein	0
ja	1

Tabelle 5.4.2.1f: Beurteilungsschema für das Vorhandensein von Haarfollikeln (histologischer Schnitt, Vergrößerung 200x)

Vorhandensein von Haarfollikeln	Score
nein	0
ja	1

5.4.2.2. QUANTITATIVE EVALUATION

An den in den Computer eingelesenen Bildern der HE gefärbten histologischen Schnitte wurden mit Hilfe eines Computerprogrammes (Image Access 10 Standard, Imagic, Bildverarbeitung, AG, Glattburg, Schweiz) folgende Messungen durchgeführt: Länge des Hautdefektes, Länge der offenen Wunde, Dicke der Narbe in der Wundmitte und Dicke der Narbe am Wundrand. (siehe Tabelle. 5.4.2.2a und Abbildung 13). Mit den gemessenen Werten wurden folgende Parameter berechnet: Länge des neu gebildeten Epithels, horizontale Wundkontraktion und vertikale Wunddepression.

Tabelle 5.4.2.2a: Gemessene quantitative Parameter an den HE gefärbten histologischen Schnitten

Gemessene quantitative Parameter	
Länge des Hautdefektes (µm)	Länge der Wunde zwischen „rechter“ und „linker“ intakter Haut, inklusive des neu gebildeten Epithels
Länge der offenen Wunde (µm)	Länge der nicht epithelisierten Wunde
Dicke der Narbe in der Wundmitte (µm)	Abstand der Narbenoberfläche zum darunterliegenden Bindegewebe
Dicke der Narbe an den Wundrändern (µm)	Abstand der Narbenoberfläche zum darunterliegenden Bindegewebe an beiden Narbenrändern, Mittelwerte beider Messungen einer Wunde („rechts“ und „links“)

Tabelle 5.4.2.2b: Berechnete quantitative Parameter an den HE gefärbten histologischen Schnitten

Berechnete quantitative Parameter	
Länge des neu gebildeten Epithels (µm)	Differenz zwischen der Länge des Defektes und der Länge der offenen Wunde
Horizontale Wundkontraktion (%)	Prozentuales Verhältnis zwischen dem Durchmesser des Defektes am Operationstag und dem am Euthanasietag
Vertikale Wunddepression (%)	Prozentuales Verhältnis zwischen der Dicke der Wunde am Rand (Mittelwert aus den Messungen am „rechten“ und „linken“ Rand) und in der Mitte des Defektes

5.4.2.3. AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOLOGISCH GEFÄRBTEN HISTOLOGISCHEN SCHNITTE

Die mit immunhistologischen Methoden auf die Expression von α -SMA bearbeiteten Schnitte wurden in der Mitte der Wunde und am rechten und linken Wundrand auf eine positive Antikörper-Antigenreaktion untersucht, die als rote Farbreaktion sichtbar war. Die Farbintensität wurde anhand eines Scoringsystems bewertet (siehe Tabelle 5.4.2.3 und Abbildung 14).

Tabelle 5.4.2.3: Beurteilungsschema für die Auswertung der α -SMA-Expression

Farbintensität der positiven Reaktion für α -SMA-Expression	Score
keine	0
leicht	1
mittel	2
hoch	3
sehr hoch	4

5.5. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Mit Hilfe eines Statistikprogrammes (IBM®SPSS 21) wurden die ermittelten Werte analysiert. Als statistisch signifikant wurden alle p-Werte < 0.05 bewertet. Die quantitativen Daten wurden einem one sample t-Test und einem two sample t-Test, die kategoriellen Daten einem Fischer Test unterzogen.

6. RESULTATE

6.1. IN VIVO STUDIE

6.1.1. OPERATION

Bei allen 6 Ratten verlief die Operation wie geplant und alle Tiere erwachten komplikationslos aus der Narkose. Der operative Eingriff dauerte zwischen 15 und 60 Minuten (Durchschnitt: 26.66 Minuten) pro Tier. Bei 2 Ratten (Ratte 43.03 und Ratte 43.05) musste die Hydrogel-Applikation wiederholt werden, da das flüssige Hydrogel aus der Wunde abgetropft war. 2 Tiere (Ratte 43.03 und Ratte 43.06) wiesen mittelgradige Blutungen nach der Stanzbiopsie auf. Diese Blutungen konnten aber durch leichte Kompression mit einem Tupfer gestillt werden.

6.1.2. POSTOPERATIVE PHASE

2 Ratten (Ratte 43.01 und Ratte 43.02) mussten am ersten bzw. zweiten Tag postoperativ erneut in Narkose gelegt werden, da die Verbände angeknabbert bzw. gerutscht waren. Am Tag der Operation zeigten einige Tiere ein leicht reduziertes Allgemeinbefinden. Am nächsten Tag zeigten alle Tiere wieder ein ungestörtes Verhalten.

Bei allen Ratten wurde postoperativ eine leichte Gewichtsabnahme registriert (siehe Tabellen 6.1.2a-b), die jedoch bis zum Euthanasietag meist wieder ausgeglichen war.

Die äusserste Verbandsschicht musste bei allen Tieren in den ersten Tagen erneuert werden, da sie von den Tieren teilweise beschädigt worden war. Die inneren Anteile des Verbandes waren nicht betroffen. Um ein weiteres gegenseitiges Benagen zu verhindern, wurden 4 der 6 Tiere danach einzeln gehalten. Eine Ratte zeigte am ersten postoperativen Tag eine leichte leckbedingte Reizung der Haut in der Peripherie des Verbandes, die aber einige Tage später komplikationslos verheilt war.

Tabelle 6.1.2a : Gewichtstabelle der Tiere der 7-Tages-Gruppe

	Ratte 43.01	Ratte 43.02	Ratte 43.03
Einlieferungstag	173 g	170g	180g
Operationstag	220g	218g	217g
2 Tage postoperativ	225g	247g	224g
3 Tage postoperativ	216g	240g	224g
4 Tage postoperativ	219g	230g	220g
5 Tage postoperativ	220g	232g	222g

Tabelle 6.1.2b : Gewichtstabelle der Tiere der 14-Tages-Gruppe

	Ratte 43.04	Ratte 43.05	Ratte 43.06
Einlieferungstag	170g	180g	168g
Operationstag	220g	214g	214g
2 Tage postoperativ	227g	232g	231g
3 Tage postoperativ	222g	230g	226g
4 Tage postoperativ	220g	238g	217g
5 Tage postoperativ	228g	245g	221g
8 Tage postoperativ	220g	228g	216g

6.2. MAKROSKOPISCHE AUSWERTUNG

6.2.1. WUNDHEILUNGSVERLAUF

Bei der makroskopischen Beurteilung zeigte keine der Wunden eine ungewöhnliche Entzündungsreaktion. 7 Tage nach der Operation wurde bei den meisten Wunden mittelgradiges seröses oder serosanguinöses Wundsekret beobachtet. 2 Wochen postoperativ waren 6 von 12 Wunden in der 14-Tages-Gruppe abgeheilt, davon 5 mit PEG-Hydrogel behandelte Wunden und eine unbehandelte Kontrollwunde (siehe Tabelle 6.2.1a-b).

Tabelle 6.2.1a: Makroskopische Beurteilung der Hautwunden der 7-Tages-Gruppe am Euthanasietag

Ratte	Lokalisation	Material	Heilungstatus
43.01	cranial links	Hydrogel	in Granulation
	cranial rechts	Kontrolle	in Granulation
	caudal links	Kontrolle	in Granulation
	caudal rechts	Hydrogel	in Granulation
43.02	cranial links	Kontrolle	in Granulation
	cranial rechts	Hydrogel	in Granulation
	caudal links	Hydrogel	in Granulation
	caudal rechts	Kontrolle	in Granulation
43.03	cranial links	Hydrogel	in Granulation
	cranial rechts	Kontrolle	fast geschlossen
	caudal links	Kontrolle	in Granulation
	caudal rechts	Hydrogel	in Granulation

Tabelle 6.2.1b: Makroskopische Beurteilung der Hautwunden der 14-Tages-Gruppe am Euthanasietag

Ratte	Lokalisation	Material	Heilungstatus
43.04	cranial links	Hydrogel	verheilt
	cranial rechts	Kontrolle	fast geschlossen
	caudal links	Kontrolle	fast geschlossen
	caudal rechts	Hydrogel	verheilt
43.05	cranial links	Kontrolle	fast geschlossen
	cranial rechts	Hydrogel	verheilt
	caudal links	Hydrogel	verheilt
	caudal rechts	Kontrolle	verheilt
43.06	cranial links	Hydrogel	verheilt
	cranial rechts	Kontrolle	fast geschlossen
	caudal links	Kontrolle	in Granulation
	caudal rechts	Hydrogel	in Granulation

6.3. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

Bei einigen Präparaten mussten zusätzliche Schnitte angefertigt und gefärbt werden, da die Hautdefekte bei diesen Präparaten nicht ausreichend gut beurteilbar waren. Dann konnten alle Schnitte ausgewertet werden.

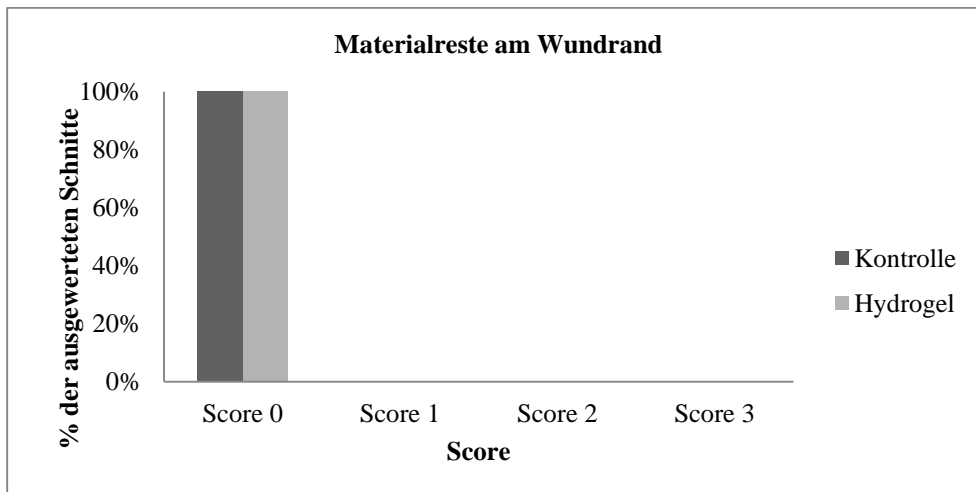
6.3.1. 7-TAGES-GRUPPE

6.3.1.1. MATERIALRESTE AM WUNDRAND (7-TAGES-GRUPPE)

In allen Schnitten (100%) der mit dem Hydrogel-behandelten Wunden und der unbehandelten Kontrollwunden wurden keine Materialreste am Wundrand gefunden. (p=1, siehe Tabelle 6.3.1.1 und Grafik 6.3.1.1).

Tabelle 6.3.1.1: Materialreste am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

Materialreste am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6= 100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6= 100%)
0%	Score 0	100%	100%
bis 25%	Score 1	0%	0%
bis 50 %	Score 2	0%	0%
100%	Score 3	0%	0%



Grafik 6.3.1.1: Materialreste am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

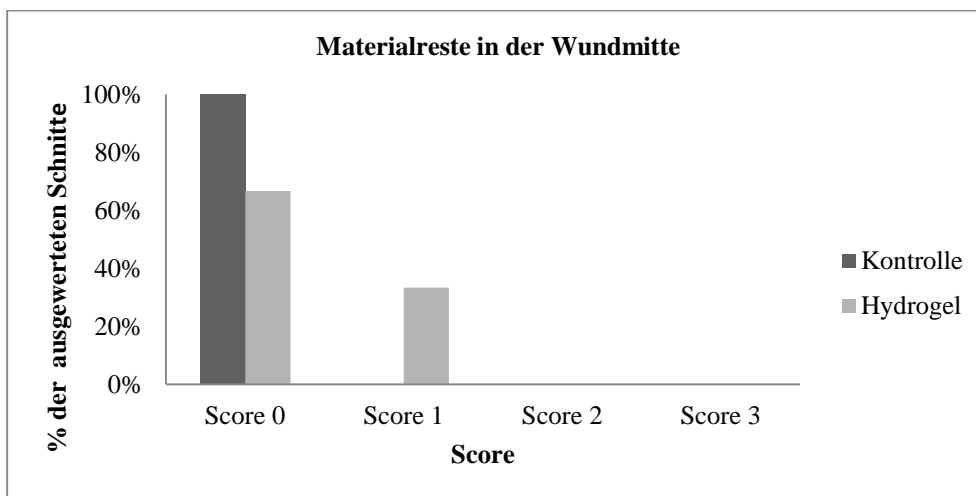
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.2. MATERIALRESTE IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

In 2 Schnitten (33.33%) der mit dem Hydrogel behandelten Wunden wurden Materialreste in der Wundmitte gefunden, in den anderen 4 Schnitten (66.66%) wurden keine Materialreste festgestellt. In keinem der Schnitte (100%) der unbehandelten Kontrollwunden wurden Materialreste gefunden ($p=0.4545$, siehe Tabelle 6.3.1.2 und Grafik 6.3.1.2).

Tabelle 6.3.1.2 : Materialreste in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

Materialreste in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
0%	Score 0	66.66%	100%
bis 25%	Score 1	33.33%	0%
bis 50 %	Score 2	0%	0%
100%	Score 3	0%	0%



Grafik 6.3.1.2: Materialreste in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

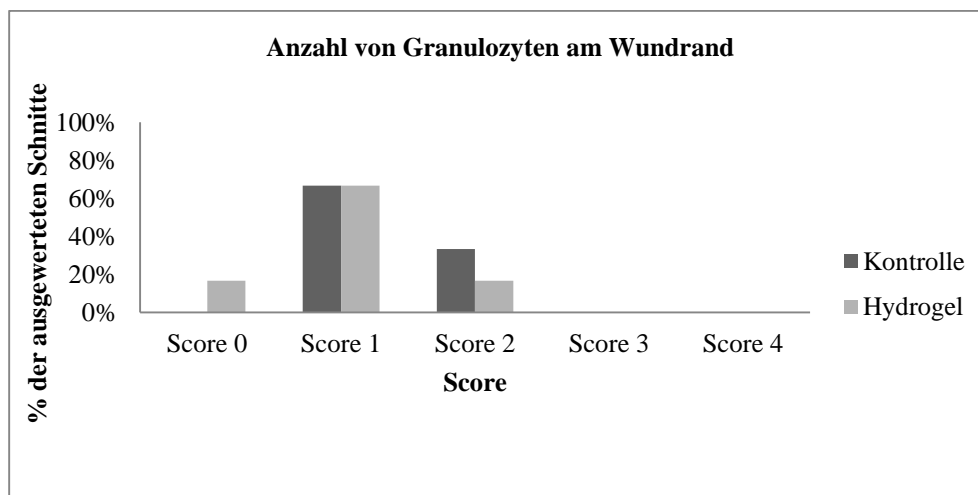
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.3. ANZAHL VON GRANULOZYTEN AM WUNDRAND (7-TAGES-GRUPPE)

Sowohl alle histologischen Schnitte der unbehandelten Kontrollwunden als auch die der mit Hydrogel-behandelten Wunden wiesen weniger als 31 Granulozyten am Wundrand auf. In jeweils 4 Schnitten (66.66%) der Hydrogel-behandelten Wunden und der unbehandelten Kontrollwunden waren weniger als 10 Granulozyten erkennbar. In jeweils einer Hydrogel-behandelten Wunde (16.66%) wurden keine bzw. zwischen 11 und 30 Granulozyten festgestellt. Bei den Schnitten von zwei unbehandelten Kontrollwunden (33.33%) wurden zwischen 11 und 30 Granulozyten gesehen. Der Unterschied zwischen den beiden Behandlungen war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.1.3 und Grafik 6.3.1.3).

Tabelle 6.3.1.3: Anzahl von Granulozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Granulozyten am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Granulozyten	Score 0	16.66%	0%
<10 Granulozyten	Score 1	66.66%	66.66%
11-30 Granulozyten	Score 2	16.66%	33.33%
31-60 Granulozyten	Score 3	0%	0%
>60 Granulozyten	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.1.3: Anzahl von Granulozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

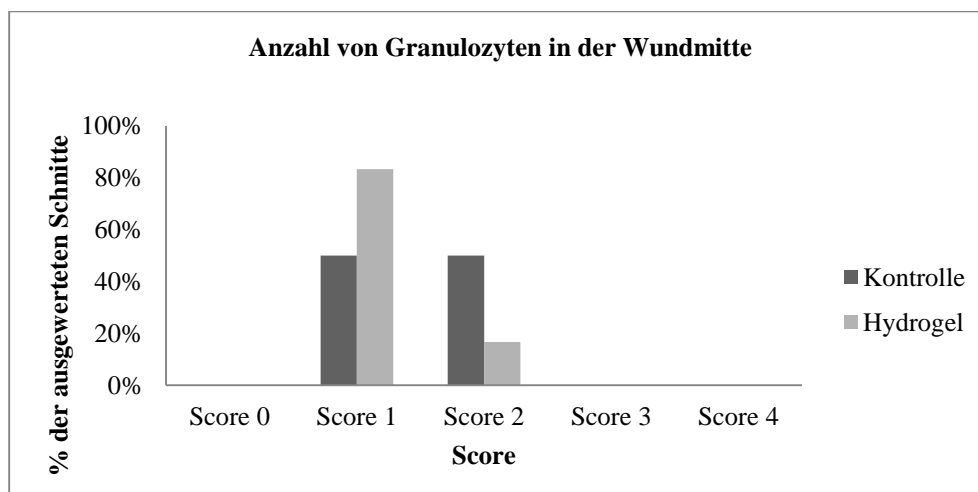
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.4. ANZAHL VON GRANULOZYTEN IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

Sowohl in den Schnitten der Kontrollwunden als auch der mit Hydrogel-behandelten Wunden waren weniger als 31 Granulozyten am Wundrand sichtbar. In fünf (83.33%) mit Hydrogel-behandelten Wunden wurden weniger als 10 und in einem Schnitt (16.66%) zwischen 11 und 30 Granulozyten festgestellt. In den unbehandelten Kontrollwunden wurden in 3 Schnitten (50%) weniger als 10 und in den anderen 3 Schnitten (50%) zwischen 11 und 30 Granulozyten festgestellt. Der Unterschied zwischen den mit Hydrogel behandelten und den unbehandelten Wunden war nicht signifikant (p-Wert = 0.5455, siehe Tabelle 6.3.1.4 und Grafik 6.3.1.4).

Tabelle 6.3.1.4: Anzahl von Granulozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Granulozyten in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
0 Granulozyten	Score 0	0%	0%
<10 Granulozyten	Score 1	83.33%	50%
11-30 Granulozyten	Score 2	16.66%	50%
31-60 Granulozyten	Score 3	0%	0%
>60 Granulozyten	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.1.4: Anzahl von Granulozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

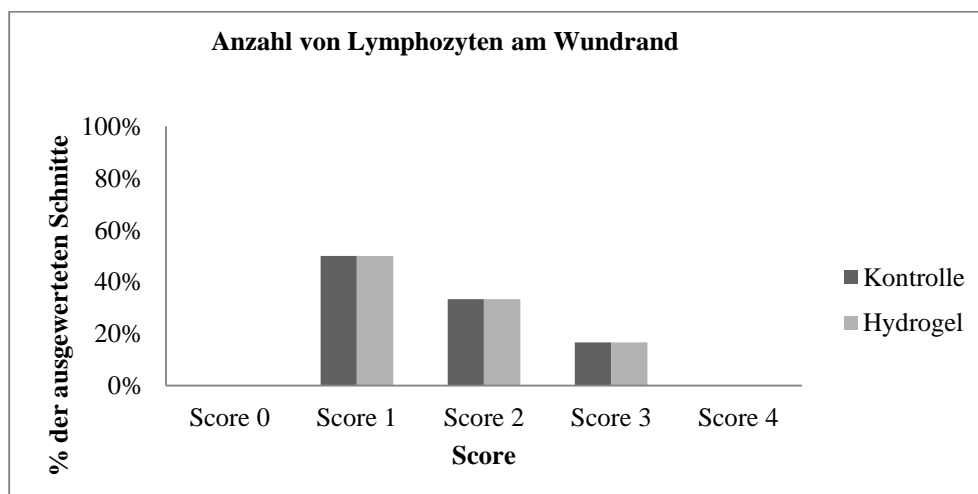
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.5. ANZAHL VON LYMPHOZYTEN AM WUNDRAND (7-TAGES-GRUPPE)

In 50% der Schnitte sowohl der mit Hydrogel behandelten Wunden als auch der unbehandelten Kontrollwunden wurden weniger als 10 Lymphozyten am Wundrand gefunden, ein Drittel (33.33%) der Schnitte beider Gruppen zeigte 11-30 Lymphozyten und 16.66% zeigten mehr als 30, aber unter 60 Lymphozyten. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit Hydrogel behandelten und den unbehandelten Kontrollwunden ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.1.5 und Grafik 6.3.1.5).

Tabelle 6.3.1.5: Anzahl von Lymphozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Lymphozyten am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Lymphozyten	Score 0	0	0
<10 Lymphozyten	Score 1	50%	50%
11-30 Lymphozyten	Score 2	33.33%	33.33%
31-60 Lymphozyten	Score 3	16.66%	16.66%
>60 Lymphozyten	Score 4	0	0



Grafik 6.3.1.5: Anzahl von Lymphozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

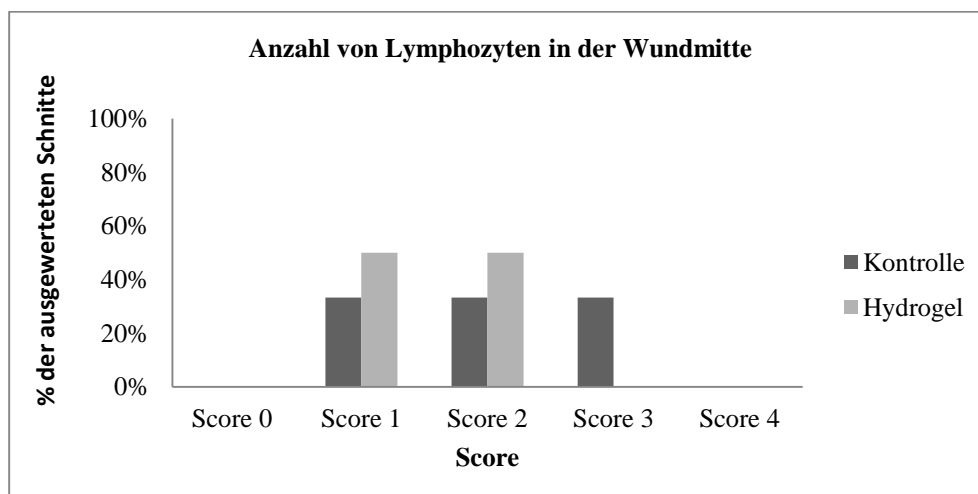
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.6. ANZAHL VON LYMPHOZYTEN IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

Bei den mit Hydrogel behandelten Wunden zeigten 50% der Schnitte (3 Schnitte) weniger als 10 Lymphozyten in der Wundmitte. Die drei anderen Schnitte wiesen 11-30 Lymphozyten auf. In den unbehandelten Kontrollwunden konnten bei jeweils 33.33% (jeweils 2 Schnitte) der Schnitte mehr als 10, 11-30 bzw. 31-60 Lymphozyten in der Wundmitte gefunden werden. Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war nicht signifikant ($p=0.5671$, siehe Tabelle 6.3.1.6 und Grafik 6.3.1.6).

Tabelle 6.3.1.6: Anzahl von Lymphozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Lymphozyten in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Lymphozyten	Score 0	0%	0%
<10 Lymphozyten	Score 1	50%	33.33%
11-30 Lymphozyten	Score 2	50%	33.33%
31-60 Lymphozyten	Score 3	0%	33.33%
>60 Lymphozyten	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.1.6: Anzahl von Lymphozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

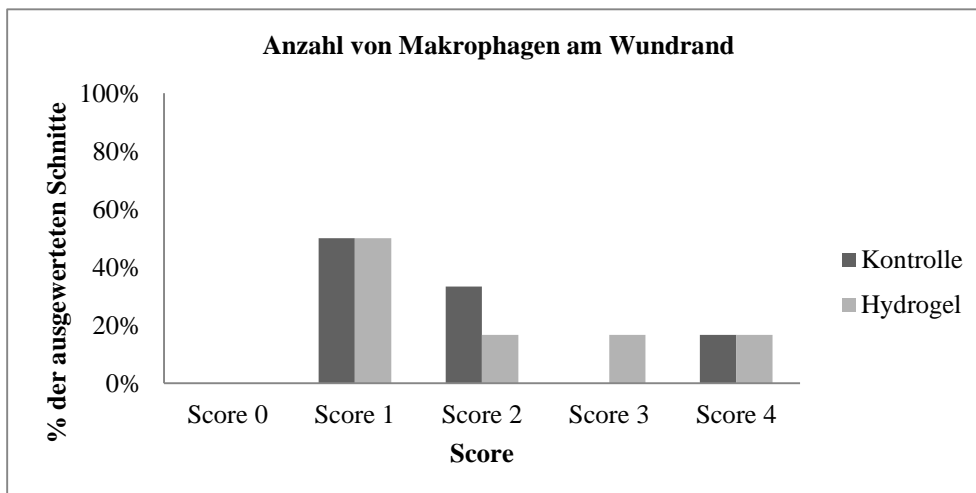
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.7. ANZAHL VON MAKROPHAGEN AM WUNDRAND (7-TAGES-GRUPPE)

Sowohl in den mit Hydrogel behandelten als auch den unbehandelten Kontrollwunden wurden in 50% der Schnitte (3 Schnitte) weniger als 10 Makrophagen am Wundrand gesehen und in 16.66% der Schnitte (1 Schnitt) mehr als 60 Makrophagen. Bei den Hydrogel-behandelten Wunden wurden in einem Schnitt (16.66%) zwischen 11 und 30 Makrophagen und bei dem anderen Schnitt zwischen 31 und 60 Makrophagen gesehen. Bei den unbehandelten Kontrollwunden wurden in 2 Schnitten (33.33%) zwischen 11 und 30 Makrophagen am Wundrand festgestellt. Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.1.7 und Grafik 6.3.1.7).

Tabelle 6.3.1.7: Anzahl von Makrophagen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Makrophagen am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Makrophagen	Score 0	0%	0%
<10 Makrophagen	Score 1	50%	50%
11-30 Makrophagen	Score 2	16.66%	33.33%
31-60 Makrophagen	Score 3	16.66%	0%
>60 Makrophagen	Score 4	16.66%	16.66%



Grafik 6.3.1.7: Anzahl von Makrophagen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

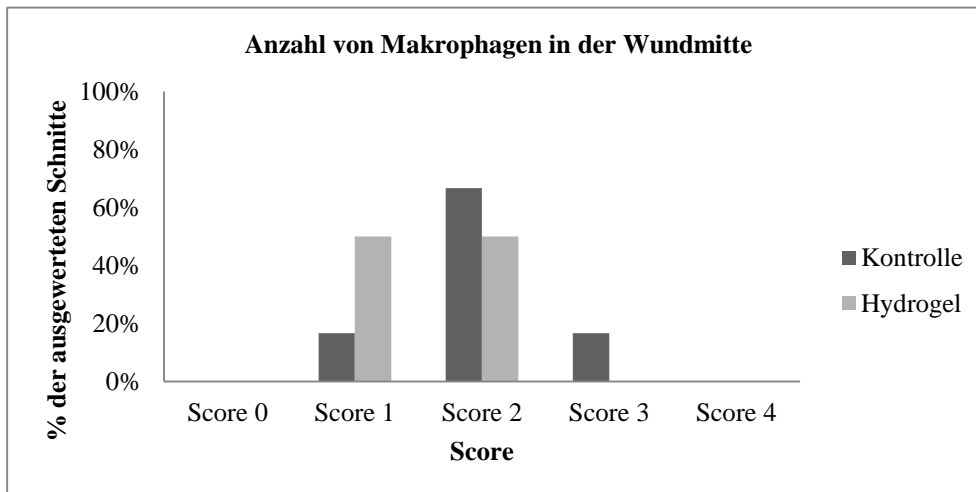
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.8. ANZAHL VON MAKROPHAGEN IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

In den mit Hydrogel behandelten Wunden wurde in 50% der betreffenden Schnitte (3 Schnitte) weniger als 10 Makrophagen und in 50% der Schnitte (3 Schnitte) zwischen 11 und 30 Makrophagen in der Wundmitte gesehen. In den unbehandelten Kontrollwunden wurden in 4 Schnitten (66.66%) zwischen 11 und 30 Makrophagen festgestellt. In einem Schnitt (16.66%) wurden weniger als 10 Makrophagen gesehen und in dem anderen Schnitt (16.66%) zwischen 31 und 60 Makrophagen festgestellt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.5455$, siehe Tabelle 6.3.1.8 und Grafik 6.3.1.8).

Tabelle 6.3.1.8: Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
0 Makrophagen	Score 0	0%	0%
<10 Makrophagen	Score 1	50%	16.66%
11-30 Makrophagen	Score 2	50%	66.66%
31-60 Makrophagen	Score 3	0%	16.66%
>60 Makrophagen	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.1.8: Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

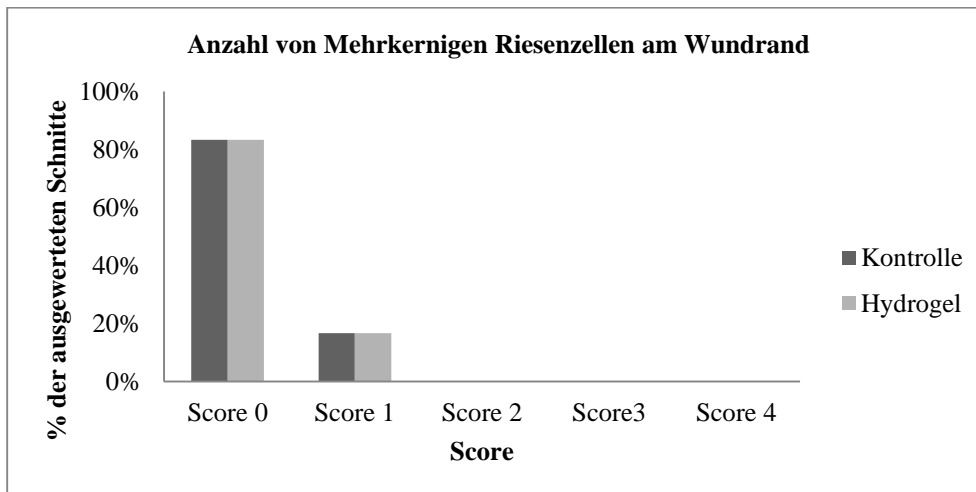
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.9. ANZAHL VON MEHRKERNIGEN RIESENZELLEN AM WUNDRAND (7-TAGES-GRUPPE)

In den Hydrogel-behandelten Wunden und in den unbehandelten Kontrollwunden wurden in 83.33% der Wunden (5 Schnitte) keine und in 16.66% (1 Schnitt) der Wunden weniger als 10 Mehrkernige Riesenzellen am Wundrand gesehen. Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.1.9 und Grafik 6.3.1.9).

Tabelle 6.3.1.9: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen am Wundrand/ Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Riesenzellen	Score 0	83.33%	83.33%
<10 Riesenzellen	Score 1	16.66%	16.66%
11-30 Riesenzellen	Score 2	0%	0%
31-60 Riesenzellen	Score 3	0%	0%
>60 Riesenzellen	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.1.9: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

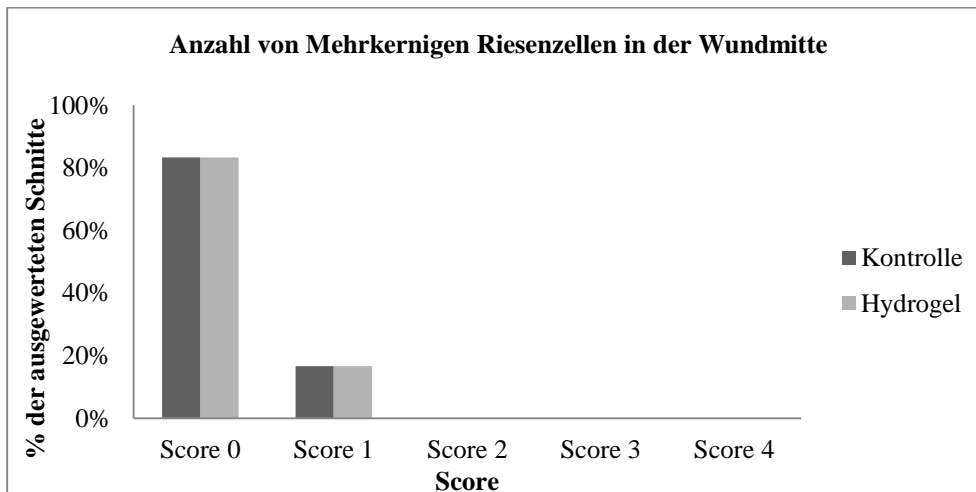
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.10. ANZAHL VON MEHRKERNIGEN RIESENZELLEN IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

In jeweils 83.33% (5 Schnitte) der Hydrogel-behandelten und der unbehandelten Kontrollwunden wurden keine und in jeweils 16.66% (1 Schnitt) der Wunden weniger als 10 Mehrkernige Riesenzellen gesehen. Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.1.10 und Grafik 6.3.1.10).

Tabelle 6.3.1.10: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Riesenzellen	Score 0	83.33%	83.33%
<10 Riesenzellen	Score 1	16.66%	16.66%
11-30 Riesenzellen	Score 2	0%	0%
31-60 Riesenzellen	Score 3	0%	0%
>60 Riesenzellen	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.1.10: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

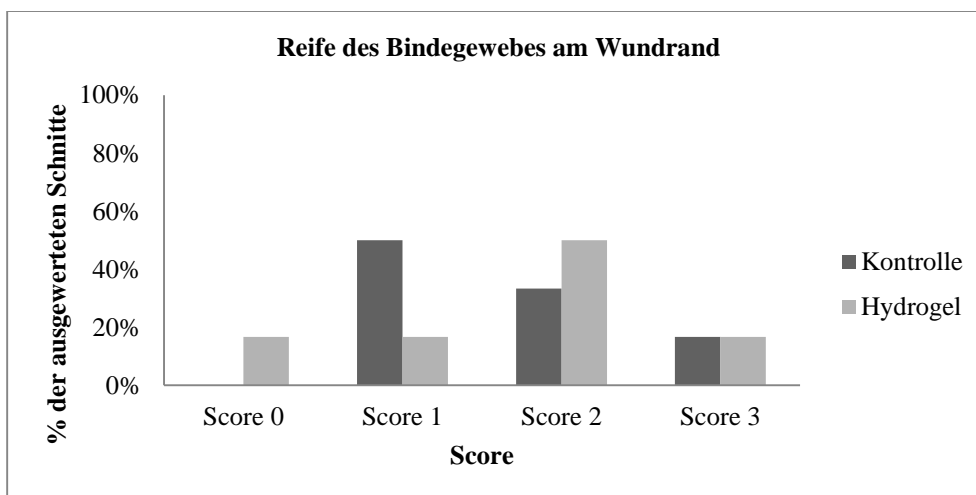
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.11. REIFE DES BINDEGEWEBES AM WUNDRAND (7-TAGES-GRUPPE)

In den mit Hydrogel behandelten Wunden wurde die Reife des Bindegewebes in 50% der Wunden (3 Schnitte) als „mehrheitlich ausgereift“ beurteilt. In je einem Schnitt (16.66%) wurde das Bindegewebe als „unreif“, „teilweise ausgereift“ und „voll ausgereift“ betrachtet. Das Bindegewebe der unbehandelten Kontrollwunden wurde in 50% der Fälle (3 Schnitte) als „teilweise ausgereift“, in 33.33% (2 Schnitte) als „mehrheitlich ausgereift“ und in einem Schnitt (16.66%) als „voll ausgereift“ beurteilt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.7403$, siehe Tabelle 6.3.1.11 und Grafik 6.3.1.11).

Tabelle 6.3.1.11: Reife des Bindegewebes am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

Reife des Bindegewebes am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
unreif	Score 0	16.66%	0%
teilweise ausgereift	Score 1	16.66%	50%
mehrheitlich ausgereift	Score 2	50%	33.33%
voll ausgereift	Score 3	16.66%	16.66%



Grafik 6.3.1.11: Reife des Bindegewebes am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

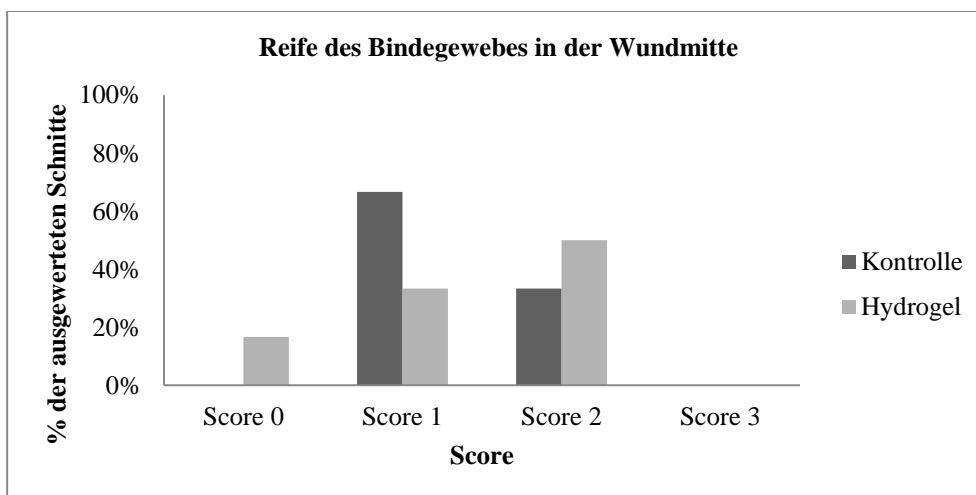
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.12. REIFE DES BINDEGEWEBES IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

In den mit Hydrogel behandelten Wunden wurde die Reife des Bindegewebes in der Wundmitte in 50% der Wunden (3 Schnitte) als „mehrheitlich ausgereift“ beurteilt. In einem Schnitt (16.66%) wurde das Bindegewebe als „unreif“ und in zwei Schnitten (33.33%) als „teilweise ausgereift“ betrachtet. Das Bindegewebe der unbehandelten Kontrollwunden wurde in 66.66% der Fälle (4 Schnitte) als „teilweise ausgereift“ und in 33.33% (2 Schnitte) als „mehrheitlich ausgereift“ beurteilt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.5671$, siehe Tabelle 6.3.1.12 und Grafik 6.3.1.12).

Tabelle 6.3.1.12 Reife des Bindegewebes in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

Reife des Bindegewebes in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
unreif	Score 0	16.66%	0%
teilweise ausgereift	Score 1	33.33%	66.66%
mehrheitlich ausgereift	Score 2	50%	33.33%
voll ausgereift	Score 3	0%	0%



Grafik 6.3.1.12: Reife des Bindegewebes in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

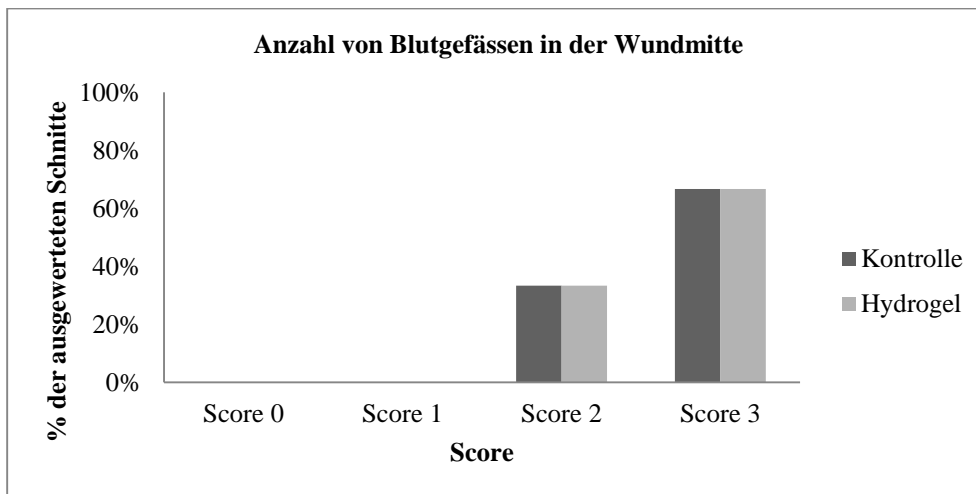
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.13. ANZAHL VON BLUTGEFÄSSEN IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

In 66.66% der Schnitte (jeweils n=4) sowohl der mit Hydrogel behandelten Wunden als auch der unbehandelten Kontrollwunden wurden mehr als 10 Blutgefäße und in 33.33% der Schnitte (2 Schnitte) zwischen 6 und 10 Blutgefäße in der Wundmitte nachgewiesen. Der Unterschied war nicht signifikant (p=1, siehe Tabelle 6.3.1.13 und Grafik 6.3.1.13).

Tabelle 6.3.1.13: Anzahl von Blutgefäßen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

Anzahl von Blutgefäße in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
0 Blutgefäße	Score 0	0%	0%
1-5 Blutgefäße	Score 1	0%	0%
6-10 Blutgefäße	Score 2	33.33%	33.33%
>10 Blutgefäße	Score 3	66.66%	66.66%



Grafik 6.3.1.13: Anzahl von Blutgefäßen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

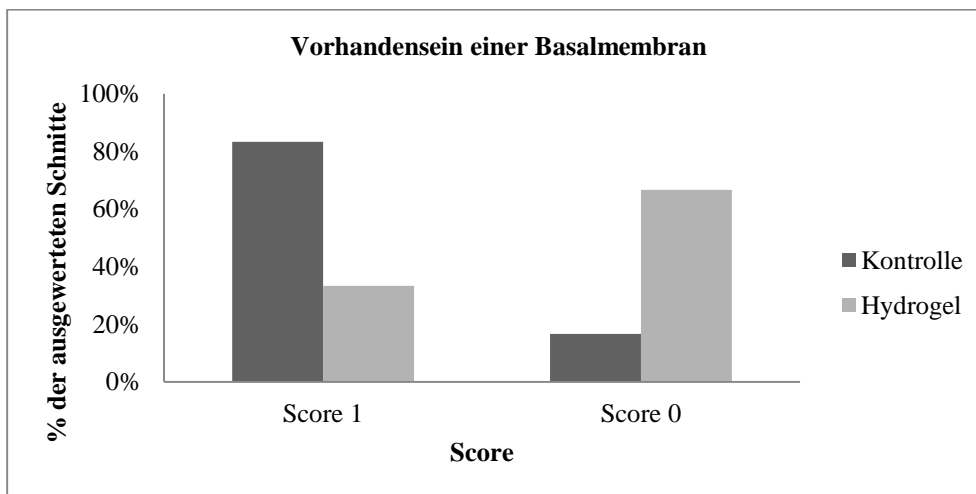
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.14. **VORHANDENSEIN EINER BASALMEMBRAN (7-TAGES-GRUPPE)**

Eine Basalmembran war in 66.66% (4 Schnitte) der mit Hydrogel behandelten Wunden und in 16.66 % (1 Schnitt) der unbehandelten Kontrollwunden sichtbar. In 2 Schnitten der Hydrogel-behandelten Wunden (33.33%) und in 5 Schnitten (83.33%) der unbehandelten Kontrollwunden wurde keine Basalmembran festgestellt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.2424$, siehe Tabelle 6.3.1.14 und Grafik 6.3.1.14).

Tabelle 6.3.1.14: Vorhandensein einer Basalmembran in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

Vorhandensein einer Basalmembran / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
nicht vorhanden	Score 1	33.33%	83.33%
vorhanden	Score 0	66.66%	16.66%



Grafik 6.3.1.14: Vorhandensein einer Basalmembran in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (7-Tages-Gruppe)

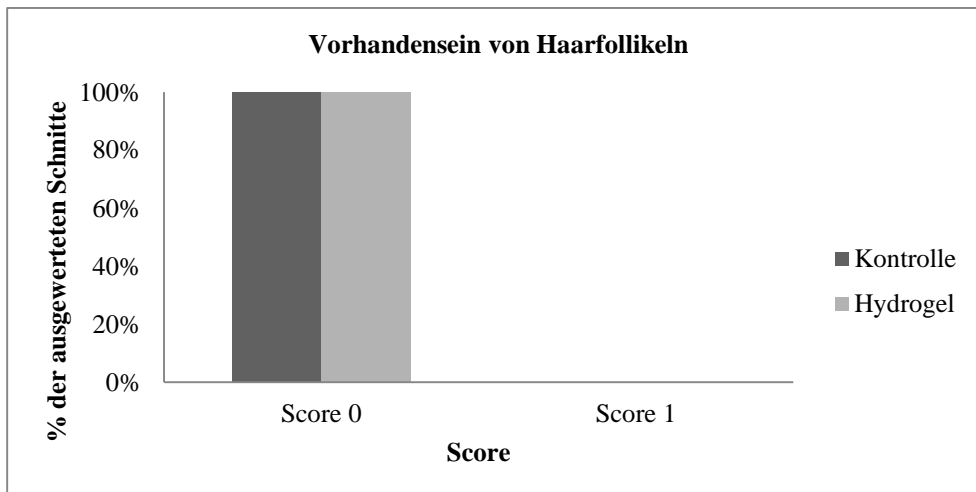
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.1.15. VORHANDENSEIN VON HAARFOLLIKELN (7-TAGES-GRUPPE)

Weder in den unbehandelten Kontrollwunden noch in denen, die mit Hydrogel behandelt wurden, waren histologisch Haarfollikel sichtbar (100% der Schnitte, 6 Schnitte, $p=1$, siehe Tabelle 6.3.1.15 und Grafik 6.3.1.15).

Tabelle 6.3.1.15: Vorhandensein von Haarfollikeln in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Vorhandensein von Haarfollikeln / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
nicht vorhanden	Score 0	100%	100%
vorhanden	Score 1	0%	0%



Grafik 6.3.1.15: Vorhandensein von Haarfollikeln in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

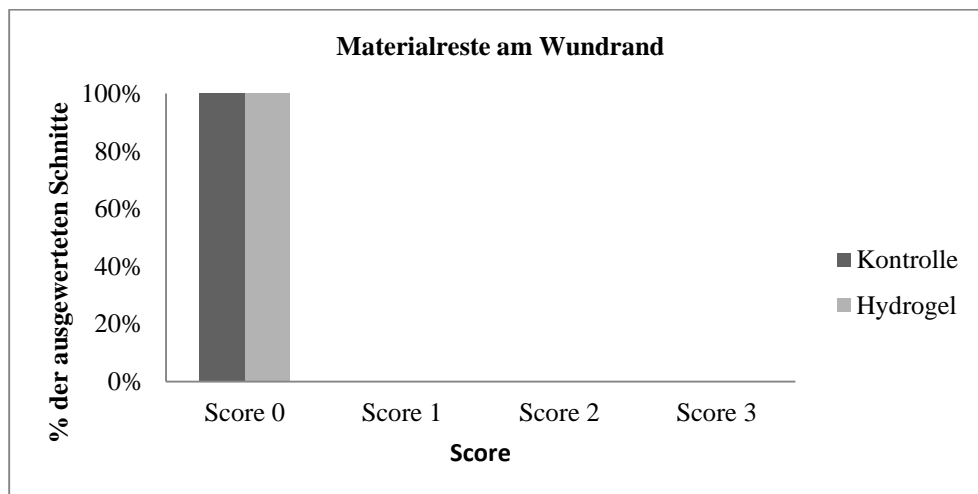
6.3.2. 14-TAGES-GRUPPE

6.3.2.1. MATERIALRESTE AM WUNDRAND (14-TAGES-GRUPPE)

In keinem der histologischen Schnitte wurden Materialreste am Wundrand gefunden. (p=1, siehe Tabelle 6.3.2.1 und Grafik 6.3.2.1).

Tabelle 6.3.2.1: Materialreste am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

Materialreste am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
0%	Score 0	100%	100%
bis 25%	Score 1	0%	0%
bis 50 %	Score 2	0%	0%
100%	Score 3	0%	0%



Grafik 6.3.2.1: Materialreste am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

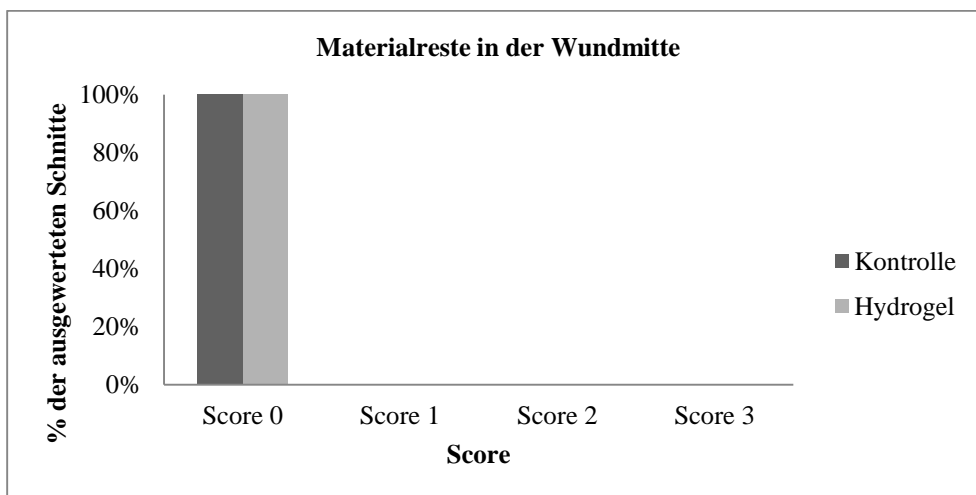
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.2. MATERIALRESTE IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

In keinem der histologischen Schnitte wurden Materialreste in der Wundmitte gefunden. (p=1, siehe Tabelle 6.3.2.2 und Grafik 6.3.2.2).

Tabelle 6.3.2.2: Materialreste in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

Materialreste in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
0%	Score 0	100%	100%
bis 25%	Score 1	0%	0%
bis 50 %	Score 2	0%	0%
100%	Score 3	0%	0%



Grafik 6.3.2.2: Materialreste in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

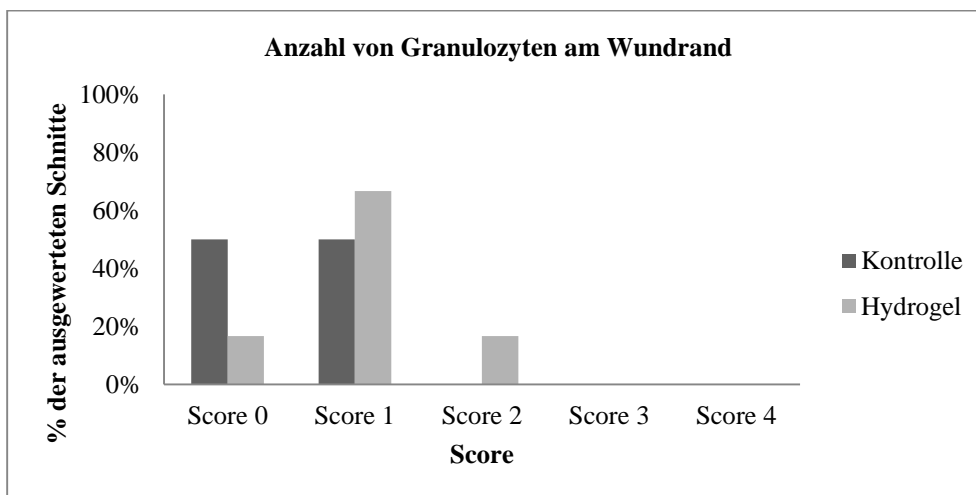
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.3. ANZAHL VON GRANULOZYTEN AM WUNDRAND (14-TAGES-GRUPPE)

In 50% der unbehandelten Kontrollwunden (3 Schnitte) wurden keine und in den anderen 50% (3 Schnitte) weniger als 10 Granulozyten pro Gesichtsfeld am Wundrand entdeckt. In 66.66% der mit Hydrogel behandelten Wunden (4 Schnitte) wurden weniger als 10 Granulozyten festgestellt. Die restlichen Schnitte der Hydrogel-behandelten Wunden wurden folgendermassen beurteilt: In je einem Schnitt (je 16.66%) wurde keine bzw. zwischen 11 und 30 Granulozyten gesehen. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.5455$, siehe Tabelle 6.3.2.3 und Grafik 6.3.2.3).

Tabelle 6.3.2.3: Anzahl von Granulozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Granulozyten am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Granulozyten	Score 0	16.66%	50%
<10 Granulozyten	Score 1	66.66%	50%
11-30 Granulozyten	Score 2	16.66%	0%
31-60 Granulozyten	Score 3	0%	0%
>60 Granulozyten	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.3: Anzahl von Granulozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

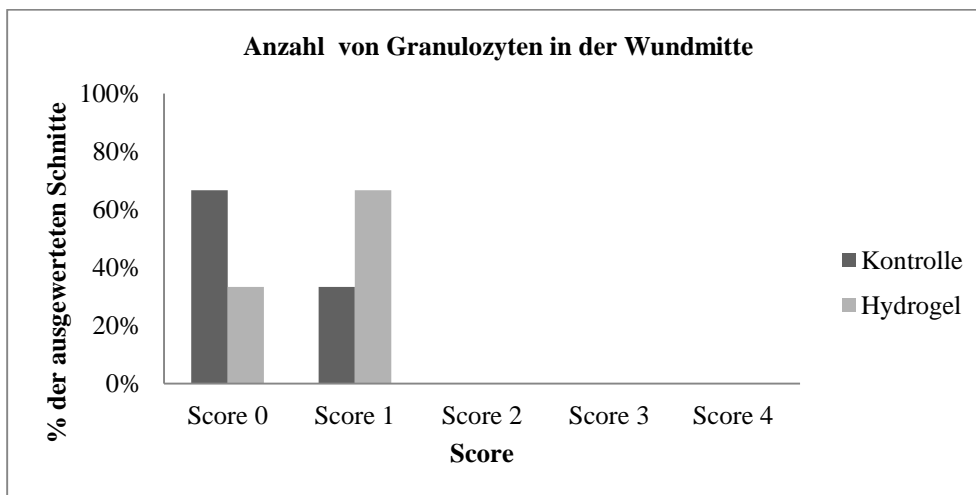
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.4. ANZAHL VON GRANULOZYTEN IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

In 66.66% der Hydrogel-behandelten Wunden (4 Schnitte) fanden sich weniger als 10 Granulozyten in der Wundmitte und in den beiden anderen Schnitten (33.33%) wurden keine Granulozyten gesehen. In den unbehandelten Kontrollwunden wurden in 66.66% der Schnitte (4 Schnitte) keine Granulozyten gefunden und in 2 Schnitten (33.33%) wurden weniger als 10 Granulozyten festgestellt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.5671$, siehe Tabelle 6.3.2.4 und Grafik 6.3.2.4).

Tabelle 6.3.2.4: Anzahl von Granulozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Granulozyten in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Granulozyten	Score 0	33.33%	66.66%
<10 Granulozyten	Score 1	66.66%	33.33%
11-30 Granulozyten	Score 2	0%	0%
31-60 Granulozyten	Score 3	0%	0%
>60 Granulozyten	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.4: Anzahl von Granulozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

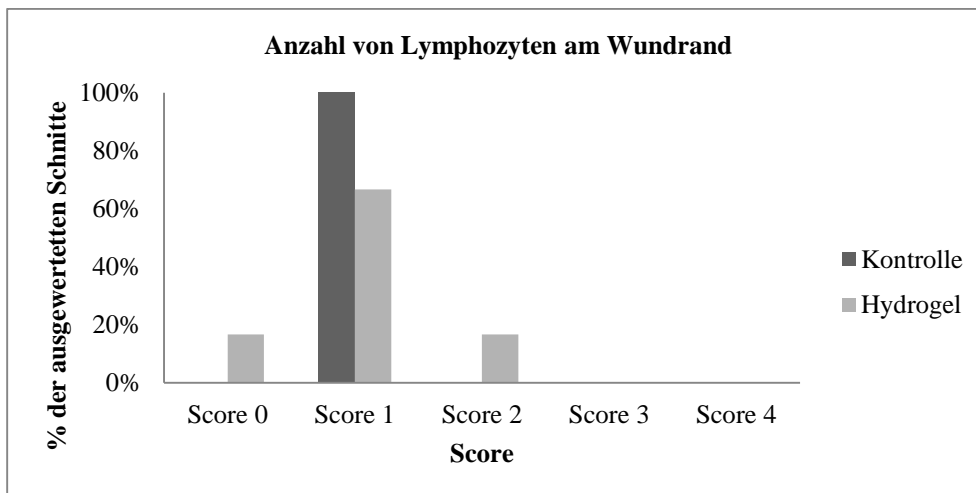
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.5. ANZAHL VON LYMPHOZYTEN AM WUNDRAND (14-TAGES-GRUPPE)

In allen unbehandelten Kontrollwunden wurden weniger als 10 Lymphozyten pro Gesichtsfeld am Wundrand gesehen. In 66.66% der mit Hydrogel behandelten Wunden (4 Schnitte) wurden weniger als 10, in je einem Schnitt (je 16.66%) wurden keine bzw. zwischen 11 und 30 Lymphozyten pro Gesichtsfeld entdeckt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.4545$, siehe Tabelle 6.3.2.5 und Grafik 6.3.2.5).

Tabelle 6.3.2.5: Anzahl von Lymphozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Lymphozyten am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Lymphozyten	Score 0	16.66%	0%
<10 Lymphozyten	Score 1	66.66%	100%
11-30 Lymphozyten	Score 2	16.66%	0%
31-60 Lymphozyten	Score 3	0%	0%
>60 Lymphozyten	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.5: Anzahl von Lymphozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

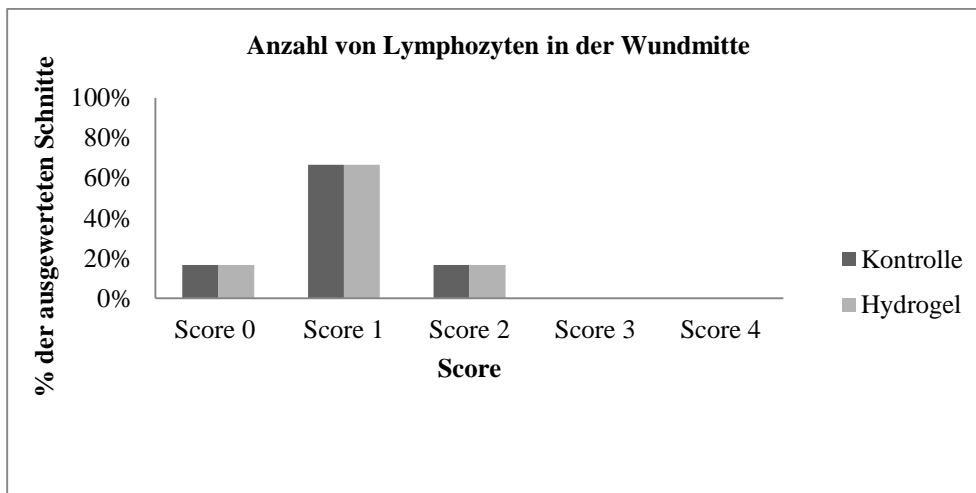
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.6. ANZAHL VON LYMPHOZYTEN IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

Sowohl in den unbehandelten Kontrollwunden als auch in den mit Hydrogel behandelten Wunden wurden in 66.66% der Wunden (4 Schnitte) weniger als 10, in je einem Schnitt (je 16.66%) keine bzw. zwischen 11 und 30 Lymphozyten in der Wundmitte gefunden. Der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.2.6 und Grafik 6.3.2.6).

Tabelle 6.3.2.6: Anzahl von Lymphozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Lymphozyten in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Lymphozyten	Score 0	16.66%	16.66%
<10 Lymphozyten	Score 1	66.66%	66.66%
11-30 Lymphozyten	Score 2	16.66%	16.66%
31-60 Lymphozyten	Score 3	0%	0%
>60 Lymphozyten	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.6: Anzahl von Lymphozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

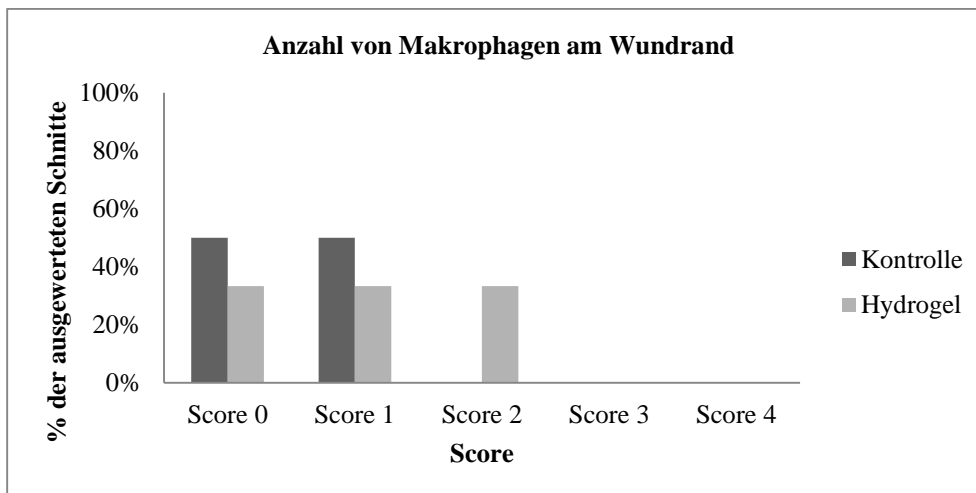
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.7. ANZAHL VON MAKROPHAGEN AM WUNDRAND (14-TAGES-GRUPPE)

In 50% der unbehandelten Kontrollwunden (3 Schnitte) wurden keine und in 50% der Wunden (3 Schnitte) weniger als 10 Makrophagen pro Gesichtsfeld am Wundrand gefunden. In je einem Drittel der mit Hydrogel behandelten Wunden (jeweils 2 Schnitte, 33.33%) wurden keine, unter 10 oder maximal 30 Makrophagen gesehen. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0.5671$, siehe Tabelle 6.3.2.7 und Grafik 6.3.2.7).

Tabelle 6.3.2.7: Anzahl von Makrophagen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Makrophagen am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Makrophagen	Score 0	33.33%	50%
<10 Makrophagen	Score 1	33.33%	50%
11-30 Makrophagen	Score 2	33.33%	0%
31-60 Makrophagen	Score 3	0%	0%
>60 Makrophagen	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.7: Anzahl von Makrophagen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

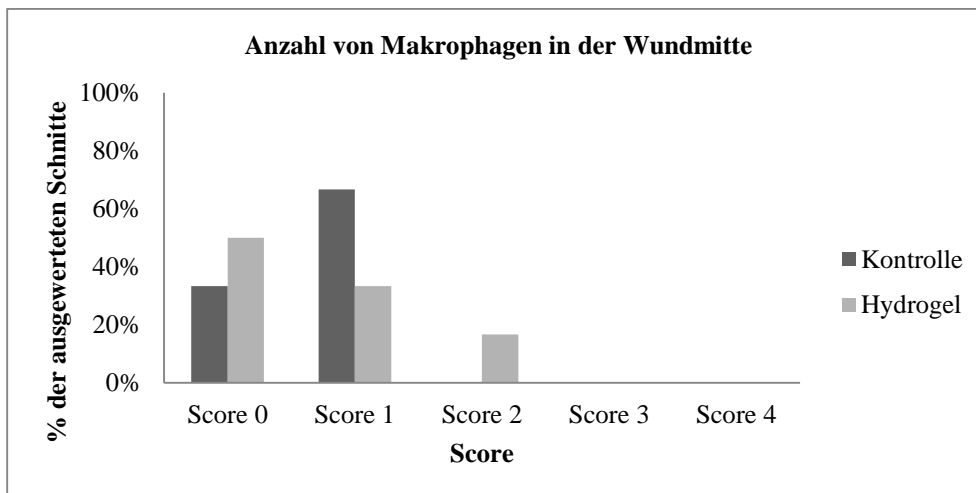
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.8. ANZAHL VON MAKROPHAGEN IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

In der Hälfte der mit Hydrogel behandelten Wunden wurden keine, in 33.33% der Wunden (2 Schnitte) unter 10 und in 16.66% (1 Schnitt) 11-30 Makrophagen pro Gesichtsfeld in der Wundmitte gefunden. Die unbehandelten Kontrollwunden wiesen in 33.33% (2 Schnitte) keine und in 66.66% (4 Schnitte) unter 10 Makrophagen auf. Die Unterschiede waren nicht signifikant ($p=0.5671$, siehe Tabelle 6.3.2.8 und Grafik 6.3.2.8).

Tabelle 6.3.2.8: Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Makrophagen	Score 0	50%	33.33%
<10 Makrophagen	Score 1	33.33%	66.66%
11-30 Makrophagen	Score 2	16.66%	0%
31-60 Makrophagen	Score 3	0%	0%
>60 Makrophagen	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.8: Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

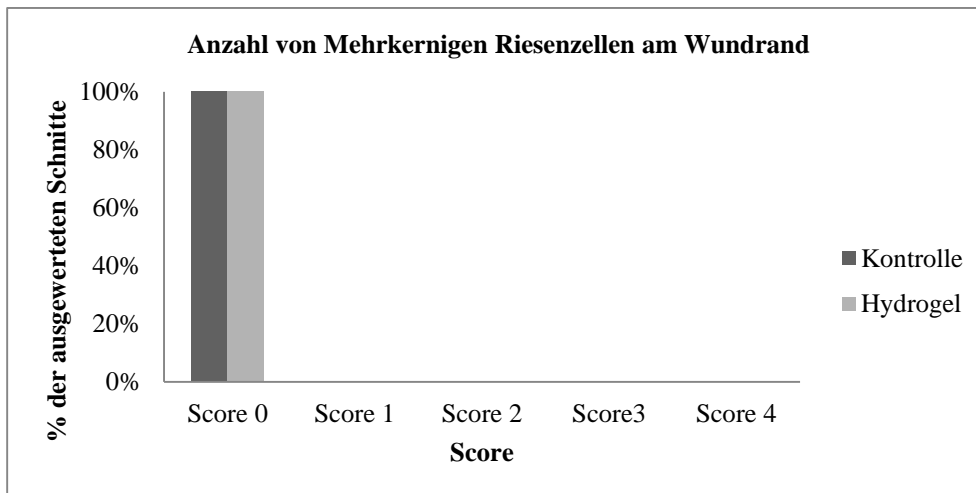
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.9. ANZAHL VON MEHRKERNIGEN RIESENZELLEN AM WUNDRAND (14-TAGES-GRUPPE)

Weder in den mit Hydrogel behandelten noch in den unbehandelten Kontrollwunden konnten Mehrkernige Riesenzellen am Wundrand nachgewiesen werden ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.2.9 und Grafik 6.3.2.9).

Tabelle 6.3.2.9: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Riesenzellen	Score 0	100%	100%
<10 Riesenzellen	Score 1	0%	0%
11-30 Riesenzellen	Score 2	0%	0%
31-60 Riesenzellen	Score 3	0%	0%
>60 Riesenzellen	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.9: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

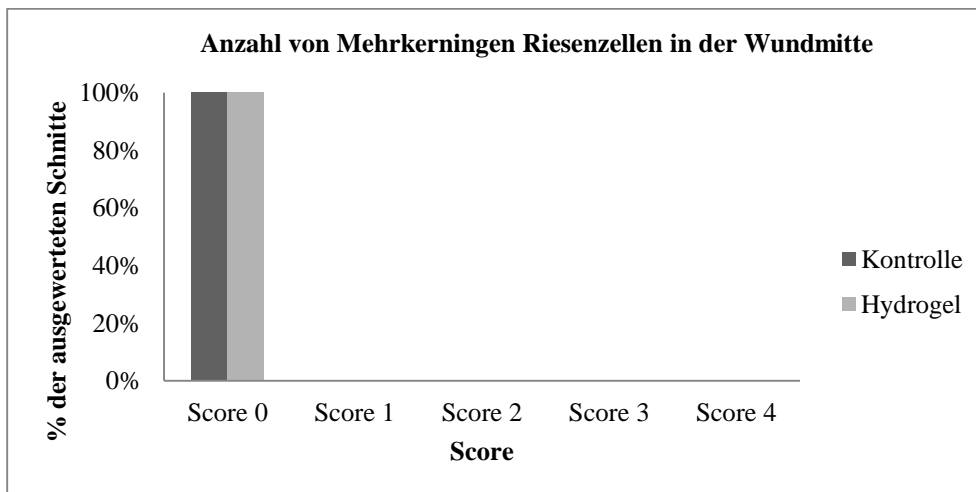
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.10. ANZAHL VON MEHRKERNIGEN RIESENZELLEN IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

Es wurden weder in den unbehandelten Kontrollwunden noch in den mit Hydrogel behandelten Wunden Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte gefunden ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.2.10 und Grafik 6.3.2.10).

Tabelle 6.3.2.10: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Riesenzellen	Score 0	100%	100%
<10 Riesenzellen	Score 1	0%	0%
11-30 Riesenzellen	Score 2	0%	0%
31-60 Riesenzellen	Score 3	0%	0%
>60 Riesenzellen	Score 4	0%	0%



Grafik 6.3.2.10: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

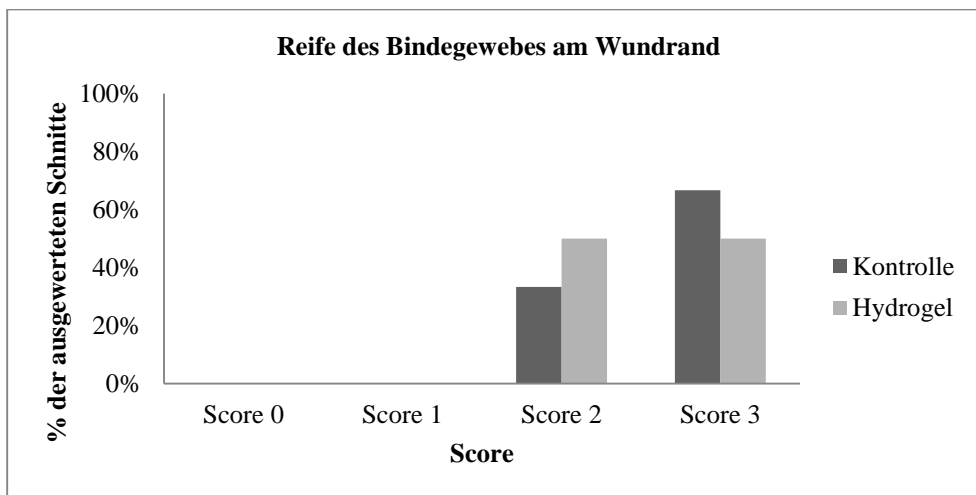
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.11. REIFE DES BINDEGEWEBES AM WUNDRAND (14-TAGES-GRUPPE)

Ein Drittel (33.33%, 2 Schnitte) der unbehandelten Kontrollwunden zeigte nach 14 Tagen ein mehrheitlich ausgereiftes, der Rest der Wunden (66.66%, 4 Schnitte) ein voll ausgereiftes Bindegewebe. Die Hydrogel-behandelten Wunden wiesen zu 50% (3 Schnitte) ein mehrheitlich ausgereiftes und zu 50% (3 Schnitte) ein voll ausgereiftes Bindegewebe auf. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.2.11 und Grafik 6.3.2.11).

Tabelle 6.3.2.11: Reife des Bindegewebes am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

Reife des Bindegewebes am Wundrand / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
unreif	Score 0	0%	0%
teilweise ausgereift	Score 1	0%	0%
mehrheitlich ausgereift	Score 2	50%	33.33%
voll ausgereift	Score 3	50%	66.66%



Grafik 6.3.2.11: Reife des Bindegewebes am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

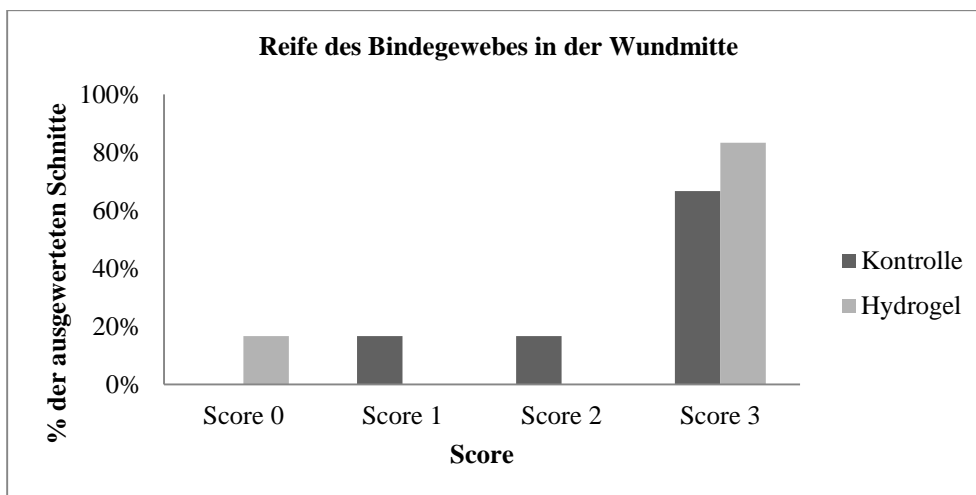
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.12. REIFE DES BINDEGEWEBES IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

83.33 % (5 Schnitte) der Hydrogel-behandelten Wunden zeigte voll ausgereiftes und 16.66% (1 Schnitt) unreifes Bindegewebe. In den unbehandelten Kontrollwunden wurde in 66.66% der Wunden (4 Schnitte) voll ausgereiftes Bindegewebe festgestellt. Teilweise ausgereiftes Bindegewebe und mehrheitlich ausgereiftes Bindegewebe wurden jeweils in einem Schnitt (je 16.66%) gesehen. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.2.12 und Grafik 6.3.2.12).

Tabelle 6.3.2.12: Reife des Bindegewebes in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

Reife des Bindegewebes in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
unreif	Score 1	16.66%	0%
teilweise ausgereift	Score 2	0%	16.66%
mehrheitlich ausgereift	Score 3	0%	16.66%
voll ausgereift	Score 4	83.33%	66.66%



Grafik 6.3.2.12: Reife des Bindegewebes in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

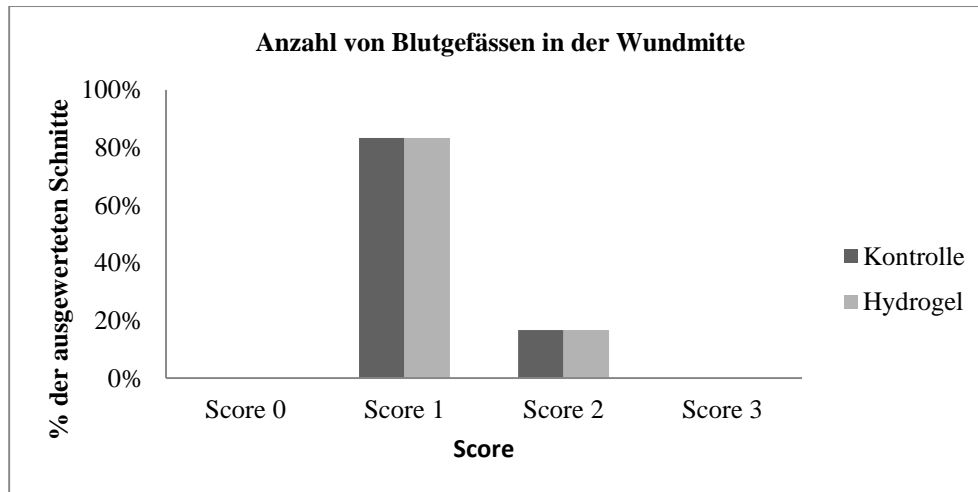
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.13. ANZAHL VON BLUTGEFÄSSEN IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

Sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden wurden in 83.33% der Wunden (5 Schnitte) 1 bis 5 und in 16.66% (1 Schnitt) zwischen 6 und 10 Blutgefäßen gefunden ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.2.13 und Grafik 6.3.2.13).

Tabelle 6.3.2.13: Anzahl von Blutgefäßen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Anzahl von Blutgefäßen in der Wundmitte / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
0 Blutgefäße	Score 0	0%	0%
1-5 Blutgefäße	Score 1	83.33%	83.33%
6-10 Blutgefäße	Score 2	16.66%	16.66%
>10 Blutgefäße	Score 3	0%	0%



Grafik 6.3.2.13: Anzahl von Blutgefäßen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

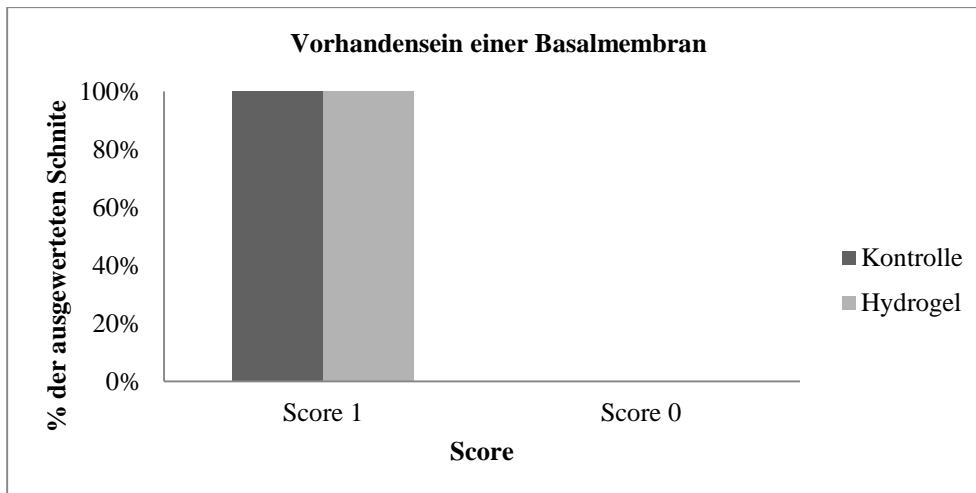
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.14. VORHANDENSEIN EINER BASALMEMBRAN (14-TAGES-GRUPPE)

In allen Wunden konnte nach 14 Tagen eine Basalmembran nachgewiesen werden (p= 1, siehe Tabelle 6.3.2.14 und Grafik 6.3.2.14).

Tabelle 6.3.2.14: Vorhandensein einer Basalmembran in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

Vorhandensein einer Basalmembran / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
nicht vorhanden	Score 0	0%	0%
vorhanden	Score 1	100%	100%



Grafik 6.3.2.14: Vorhandensein einer Basalmembran in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

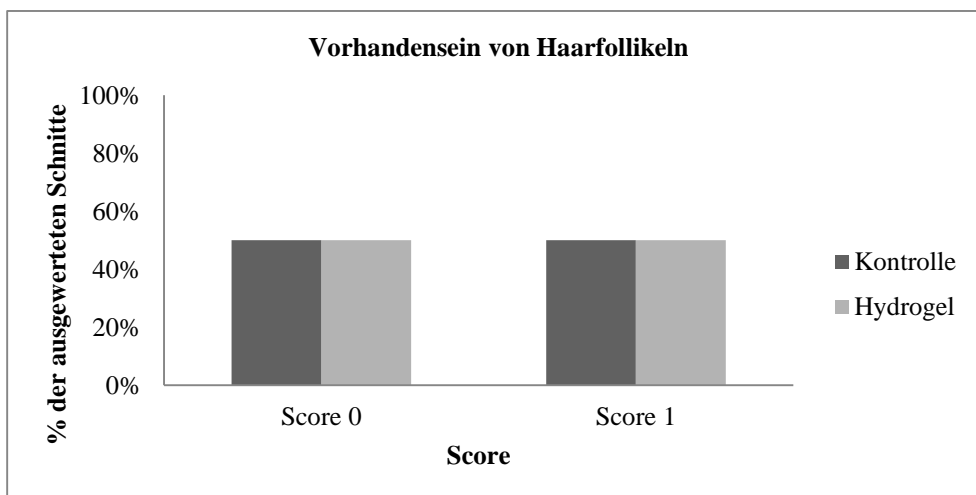
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.2.15. VORHANDENSEIN VON HAARFOLLIKELN (14-TAGES-GRUPPE)

Sowohl in den Hydrogel-behandelten als auch in den unbehandelten Wunden fanden sich in der Hälfte der Fälle (3 Schnitte) Haarfollikel im Wundbereich ($p=1$, siehe Tabelle 6.3.2.15, siehe Grafik 6.3.2.15).

Tabelle 6.3.2.15: Vorhandensein von Haarfollikeln in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

Vorhandensein von Haarfollikeln / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
nicht vorhanden	Score 0	50%	50%
vorhanden	Score 1	50%	50%



Grafik 6.3.2.15: Vorhandensein von Haarfollikeln in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (14-Tages-Gruppe)

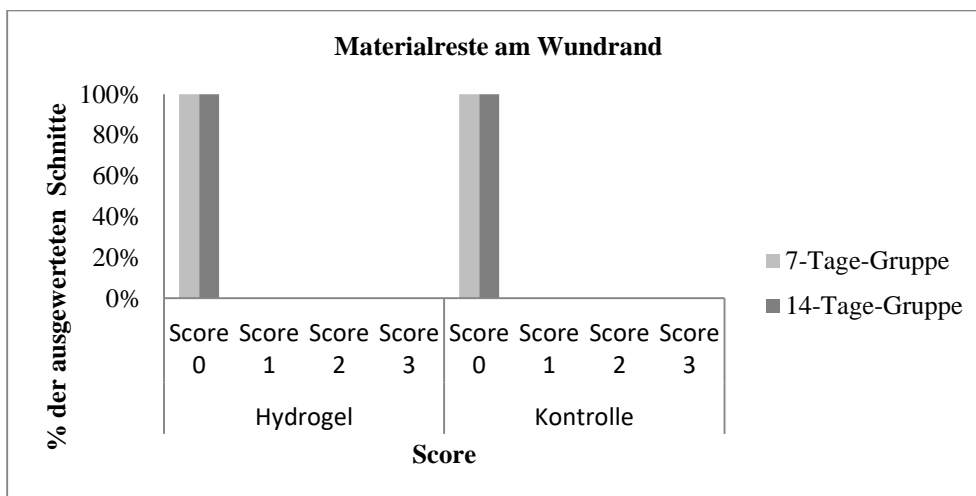
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3. VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Der Vergleich der Befunde der ausgewerteten histologischen Parameter zwischen den Wunden der 7- und der 14-Tages-Gruppe wurde gemacht, um mögliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf feststellen zu können.

6.3.3.1. MATERIALRESTE AM WUNDRAND: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

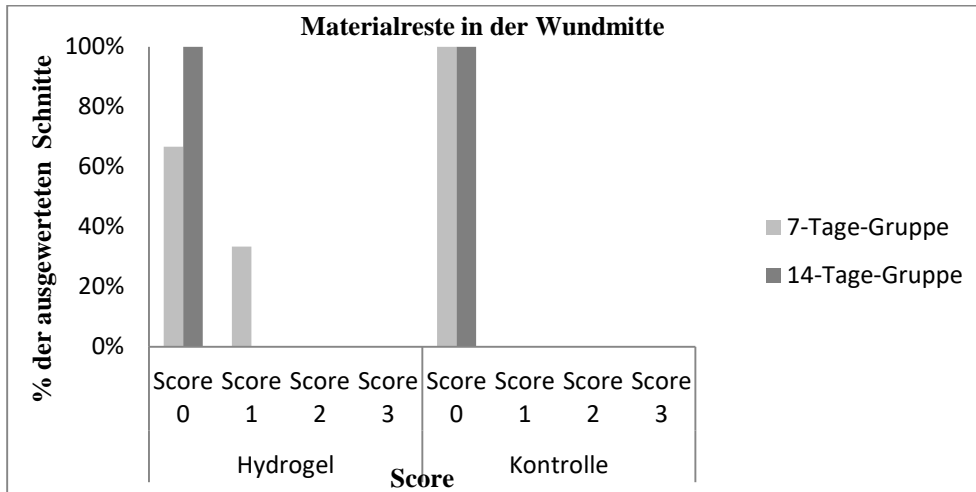
Sowohl 7 als auch 14 Tage postoperativ wurden in keiner der Wunden der beiden Behandlungsgruppen Materialreste am Rand der Wunde gefunden ($p=1$, siehe Grafik 6.3.3.1).



Grafik 6.3.3.1: Materialreste am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.2. MATERIALRESTE IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

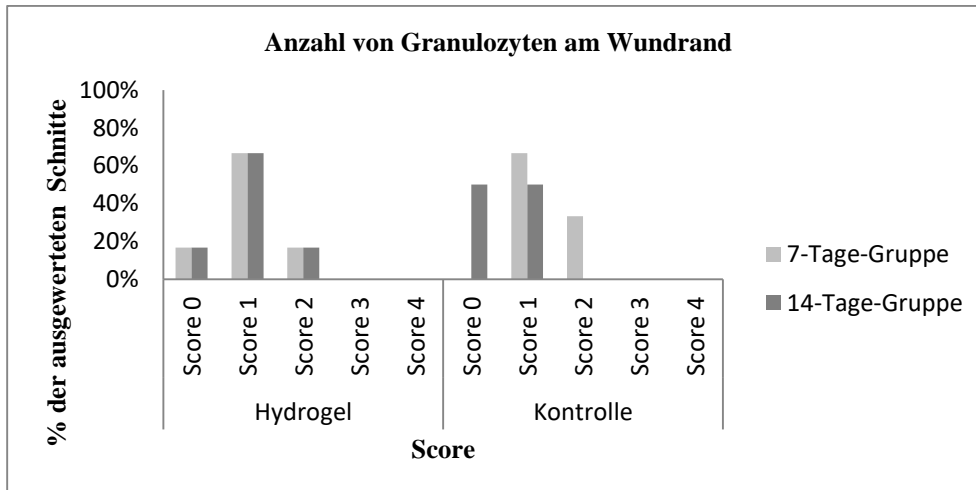
In den unbehandelten Kontrollwunden wurden sowohl in der 7-Tages-Gruppe als auch in der 14-Tages-Gruppe keine Materialreste gefunden ($p=1$, siehe Grafik 6.3.3.2). In den mit Hydrogel behandelten Wunden wurden in 4 Schnitten (66.66%) der 7-Tages-Gruppe Materialreste in der Wundmitte gefunden, in der 14-Tages-Gruppe wurden keine Materialreste mehr gesehen. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.4545$, siehe Grafik 6.3.3.2).



Grafik 6.3.3.2: Materialreste in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.3. ANZAHL VON GRANULOZYTEN AM WUNDRAND: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

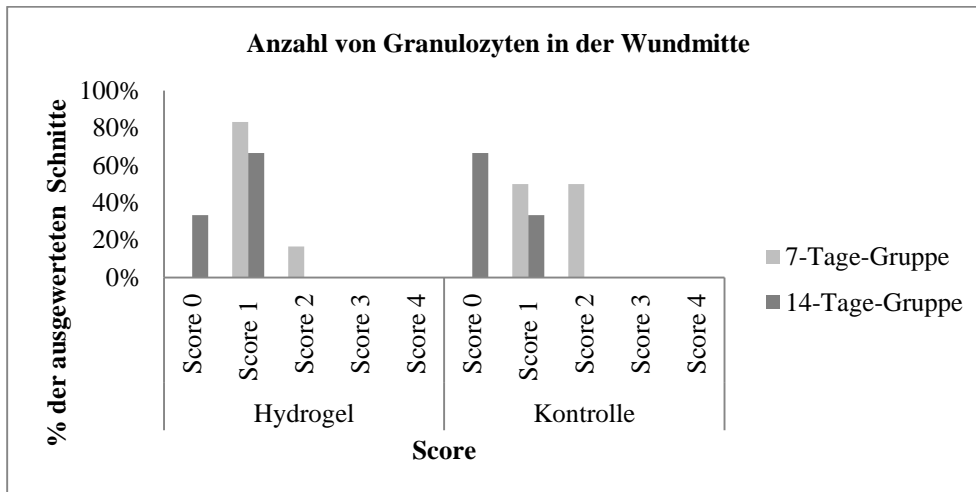
Bei den Hydrogel-behandelten Wunden blieb die Anzahl der Granulozyten am Wundrand über die Zeit gleich ($p=1$, siehe Grafik 6.3.3.3). In den unbehandelten Kontrollwunden sank die Anzahl der Granulozyten am Wundrand zwischen dem 7 und 14 Tag postoperativ, der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.09091$, siehe Grafik 6.3.3.3).



Grafik 6.3.3.3: Anzahl von Granulozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.4. ANZAHL VON GRANULOZYTEN IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

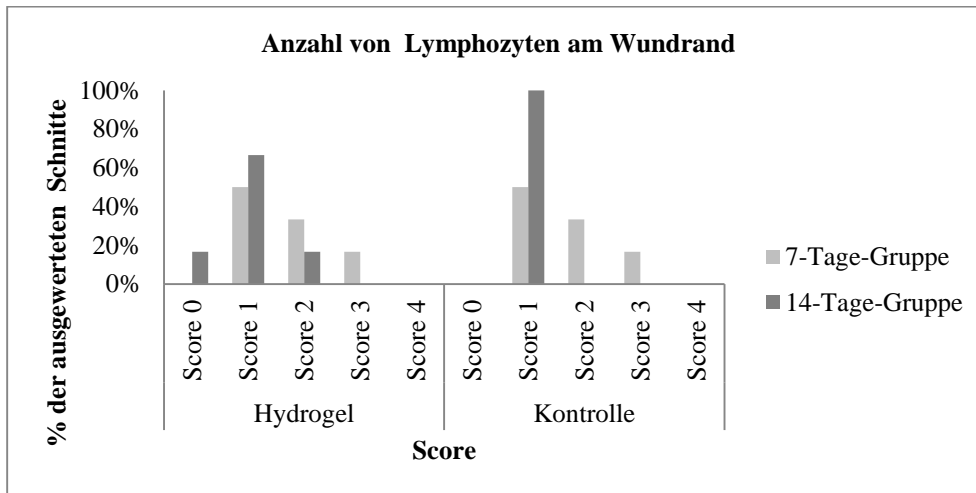
In der Wundmitte nahm die Anzahl der Granulozyten sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden über die Zeit ab. Der Unterschied zwischen der 7-Tages-Gruppe und der 14-Tages-Gruppe war bei den Hydrogel-behandelten Wunden nicht signifikant ($p=0.4545$, siehe Grafik 6.3.3.4), bei den unbehandelten Kontrollwunden jedoch signifikant ($p=0.0368$, siehe Grafik 6.3.3.4).



Grafik 6.3.3.4: Anzahl von Granulozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=12=100%. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.5. ANZAHL VON LYMPHOZYTEN AM WUNDRAND: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

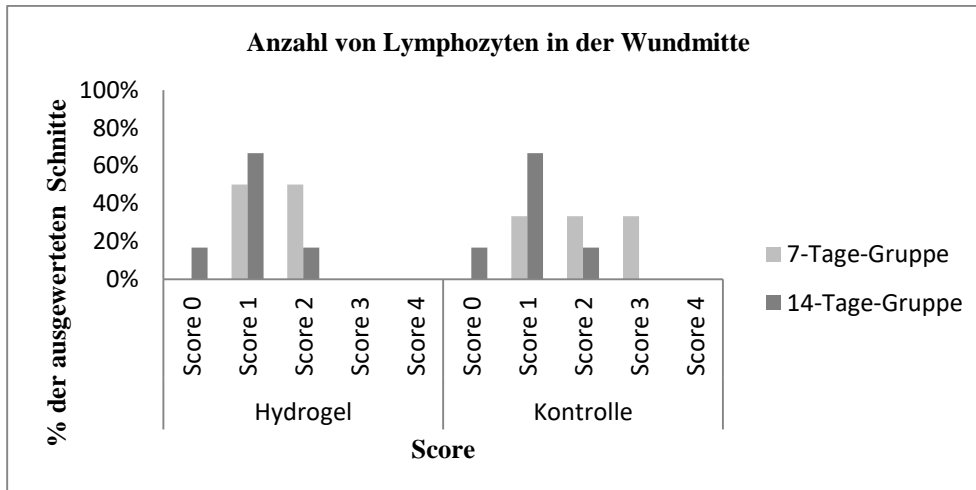
Generell nahm die Anzahl der Lymphozyten am Wundrand über die Zeit ab, sowohl in den Hydrogel-behandelten als auch in den unbehandelten Wunden. Der Unterschied zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe war jedoch weder für die unbehandelten Kontrollwunden ($p=0.1818$, siehe Grafik 6.3.3.5) noch für die Hydrogel-behandelten Wunden signifikant ($p=1$, siehe Grafik 6.3.3.5).



Grafik 6.3.3.5: Anzahl von Lymphozyten am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.6. ANZAHL VON LYMPHOZYTEN IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

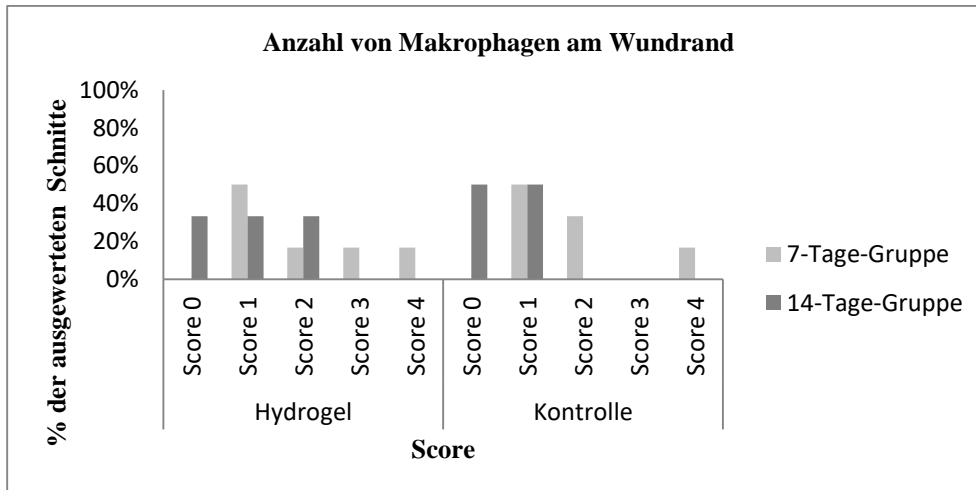
Die Anzahl der Lymphozyten in der Wundmitte nahm über die Zeit sowohl bei den Hydrogel-behandelten Wunden als auch bei den unbehandelten Kontrollwunden ab. Dieser Unterschied war weder für die Hydrogel-behandelten Wunden ($p=0.5455$, siehe Grafik 6.3.3.6), noch für die unbehandelten Kontrollwunden signifikant ($p=0.4156$, siehe Grafik 6.3.3.6).



Grafik 6.3.3.6: Anzahl von Lymphozyten in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=12=100%. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.7. ANZAHL VON MAKROPHAGEN AM WUNDRAND: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7-UND DER 14 TAGES-GRUPPE

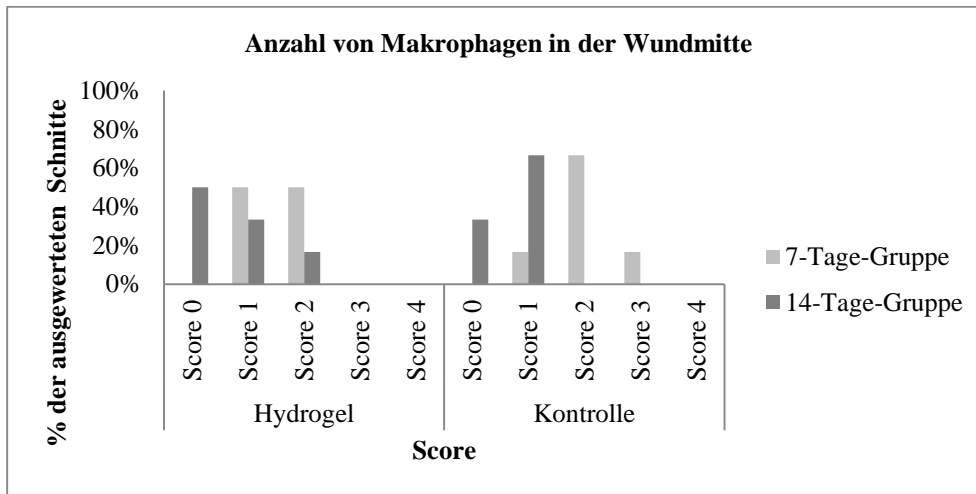
Die Anzahl der Makrophagen am Wundrand nahmen über die Zeit sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden ab. Die Unterschiede waren weder signifikant für die Hydrogel-behandelten Wunden ($p=0.6104$, siehe Grafik 6.3.3.7), noch für die unbehandelten Kontrollwunden ($p=0.1558$, siehe Grafik 6.3.3.7).



Grafik 6.3.3.7: Anzahl von Makrophagen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.8. ANZAHL VON MAKROPHAGEN IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

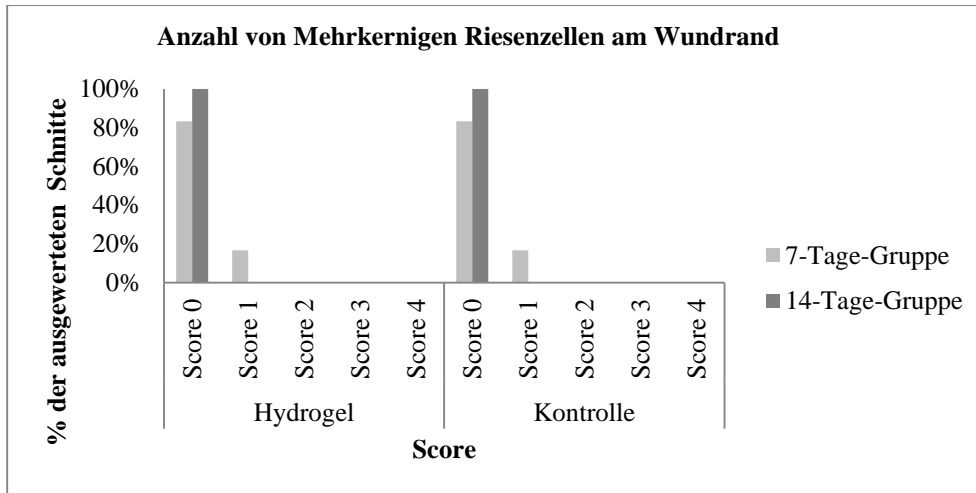
Die Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte nahm in den unbehandelten Kontrollwunden über die Zeit ab. Dieser Unterschied war signifikant ($p=0.02597$, siehe Grafik 6.3.3.8). In den Hydrogel-behandelten Wunden wurde auch eine Abnahme der Anzahl der Makrophagen in der Wundmitte über die Zeit beobachtet, dieser Unterschied war aber nicht signifikant ($p=0.2208$, siehe Grafik 6.3.3.8).



Grafik 6.3.3.8: Anzahl von Makrophagen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$). Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden,

6.3.3.9. ANZAHL VON MEHRKERNIGEN RIESENZELLEN AM WUNDRAND: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

In allen Wunden nahm die Anzahl der Mehrkernigen Riesenzellen über die Zeit ab. Es gab keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen (jeweils $p=1$ siehe Grafik 6.3.3.9).

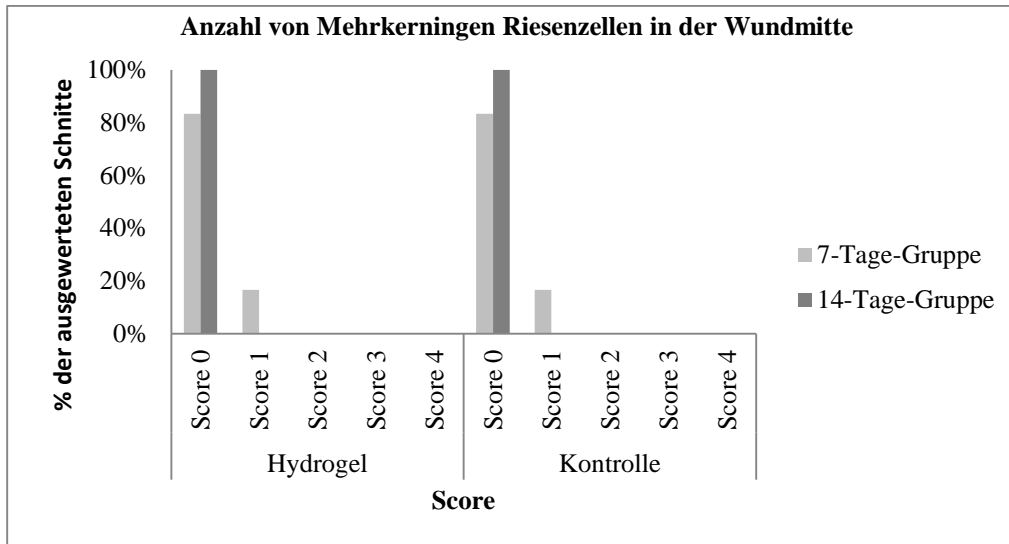


Grafik 6.3.3.9: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=12=100%). Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.10. ANZAHL VON MEHRKERNIGEN RIESENZELLEN IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

Sowohl in den unbehandelten als auch in den mit Hydrogel behandelten Wunden nahm die Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Mitte der Wunde über die Zeit ab, in allen Schnitten der 14-Tages-Gruppe wurden keine Mehrkernigen Riesenzellen mehr gesehen (jeweils $p=1$, siehe Grafik 6.3.3.10).

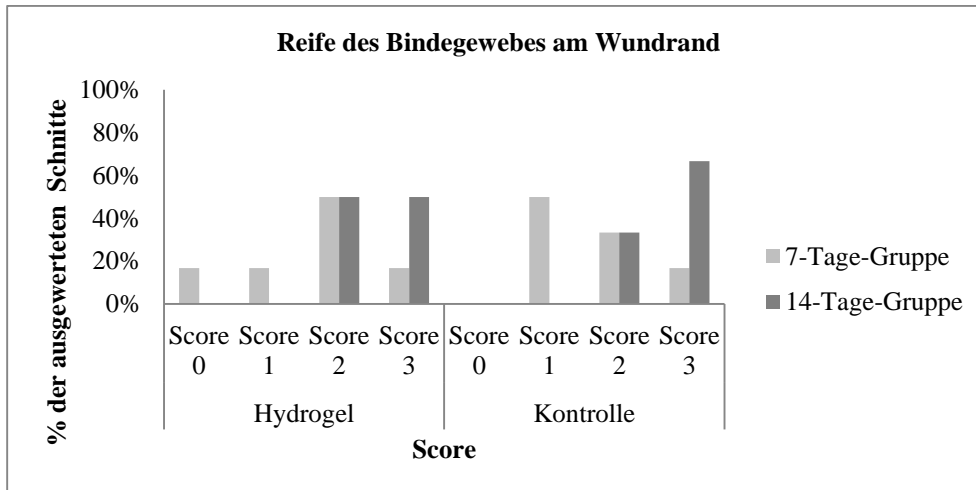


Grafik 6.3.3.10: Anzahl von Mehrkernigen Riesenzellen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.11. REIFE DES BINDEGEWEBES AM WUNDRAND: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

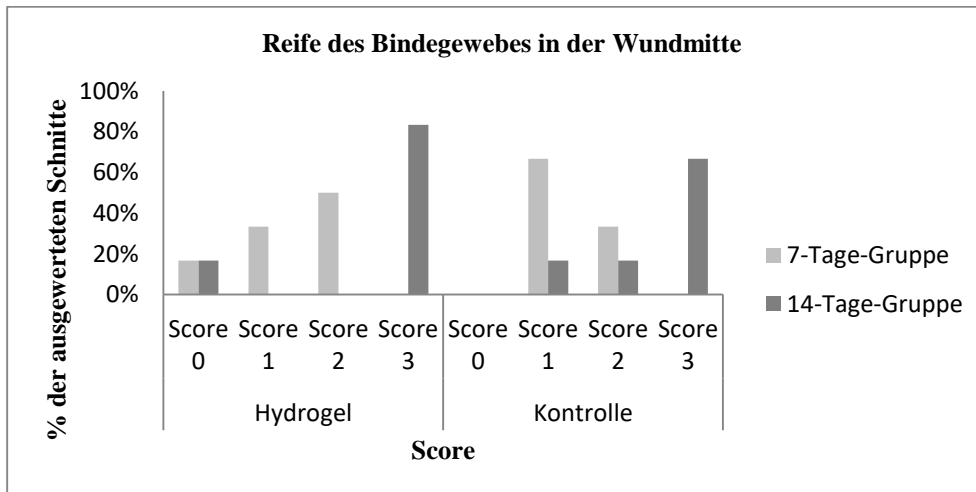
Sowohl in den unbehandelten Kontrollwunden als auch in den Hydrogel-behandelten Wunden konnte eine zunehmende Reife des Bindegewebe am Wundrand über die Zeit beobachtet werden, die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (Hydrogel-behandelte Wunden: $p=0.5455$, unbehandelte Kontrollwunden $p=0.1342$, siehe Grafik 6.3.3.11).



Grafik 6.3.3.11: Reife des Bindegewebes am Wundrand in % der ausgewerteten Schnitte, n=12=100%. Vergleich zwischen der 7-und der 14-Tages-Gruppe.
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.12. REIFE DES BINDEGEWEBES IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

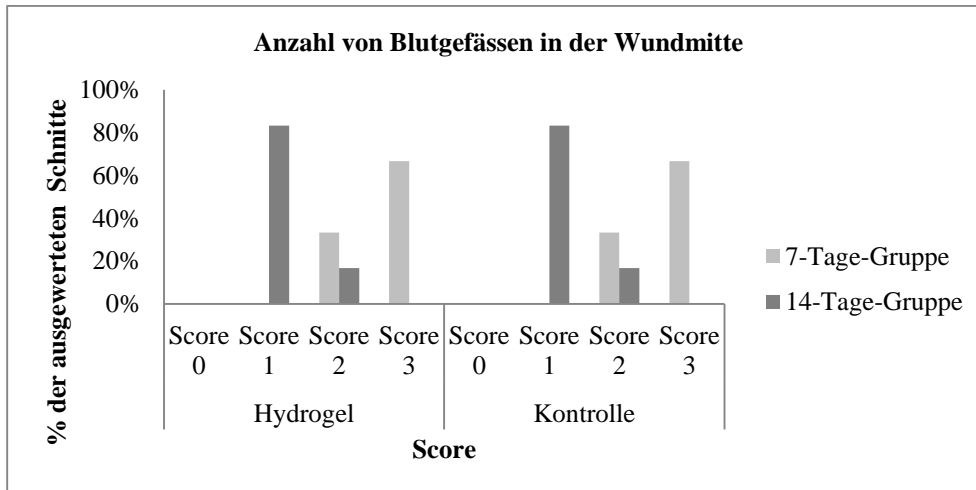
Sowohl in den unbehandelten Kontrollwunden als auch in den Hydrogel-behandelten Wunden kam es im Zeitverlauf zu einer Ausreifung des Bindegewebes in der Wundmitte. Dieser Unterschied in der Gewebereife zwischen dem 7. und dem 14. Tag postoperativ war für die mit Hydrogel behandelten Wunden signifikant ($p=0.008658$, siehe Grafik 6.3.3.12), für die unbehandelten Kontrollwunden jedoch nicht ($p=0.6926$, siehe Grafik 6.3.3.12).



Grafik 6.3.3.12: Reife des Bindegewebes in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=12=100. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.13. ANZAHL VON BLUTGEFÄSSEN IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

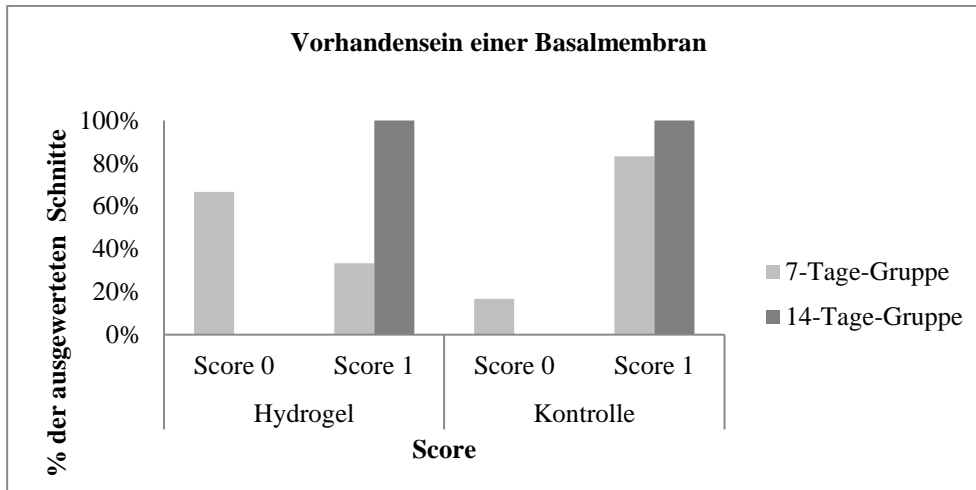
Sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden nahm die Anzahl der Blutgefäße in der Wundmitte zwischen dem 7. und 14. Tag postoperativ ab. Diese Abnahme war für beide Behandlungsgruppen signifikant (jeweils $p=0.006494$, siehe Grafik 6.3.3.13).



Grafik 6.3.3.13: Anzahl von Blutgefäßen in der Wundmitte in % der ausgewerteten Schnitte, n=12=100%. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.14. VORHANDENSEIN EINER BASALMEMBRAN: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

In beiden Behandlungsgruppen waren nach 14 Tagen mehr Basalmembranen sichtbar als 7 Tage postoperativ. Diese Steigerungen waren nicht signifikant (Hydrogel-behandelte Wunden: $p=0.06061$, siehe Grafik 6.3.3.14), unbehandelte Kontrollwunden: $p=1$, siehe Grafik 6.3.3.14).

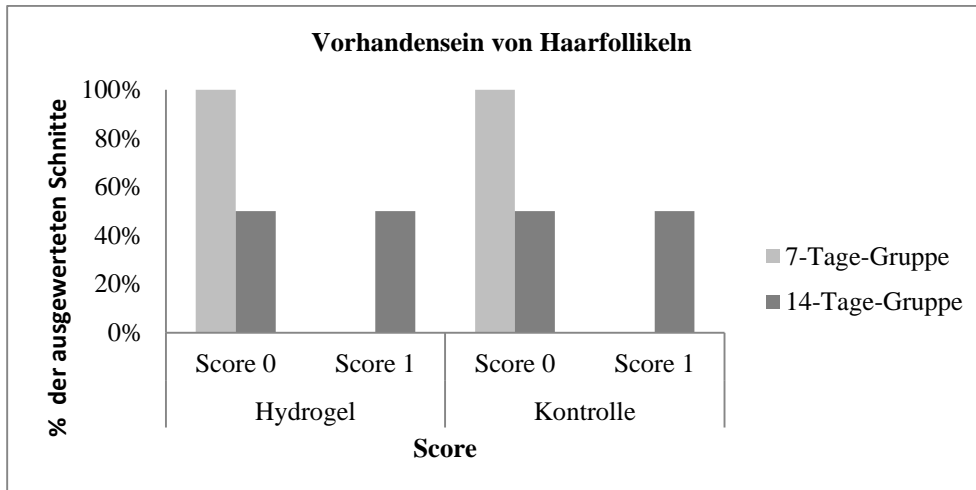


Grafik 6.3.3.14: Vorhandensein einer Basalmembran in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$). Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe.

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.3.3.15. VORHANDENSEIN VON HAARFOLLIKELN: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14 TAGES-GRUPPE

Sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden wurde eine Zunahme des Vorhandenseins von Haarfollikeln über die Zeit festgestellt. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.1818$ für beide Behandlungsgruppen, siehe Grafik 6.3.3.15).



Grafik 6.3.3.15: Vorhandensein von Haarfollikeln in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.4. IMMUNHISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

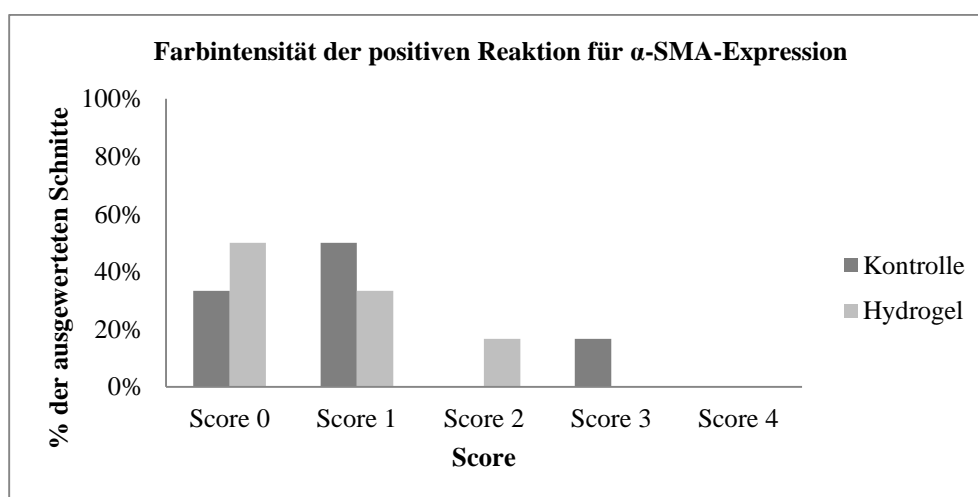
Alle zu untersuchenden Schnitte waren für die immunhistologische Beurteilung auswertbar.

6.4.1. 7-TAGES-GRUPPE

Bei 50% der histologischen Schnitte der Hydrogel-behandelten Wunden (3 Schnitte) zeigte sich keine positive Reaktion auf die immunhistochemische Anfärbung der α -SMA-Expression. Eine leichte Anfärbung dieses Parameters war in 33.33% der Schnitte (2 Schnitte) zu sehen, in 16.66% der Schnitte (1 Schnitt) war die Reaktion mittelgradig. 33.33% der Schnitte (2 Schnitte) der unbehandelten Kontrollwunden zeigten keine Reaktion, 50% (3 Schnitte) eine leichte und 16.66% (1 Schnitt) eine starke Reaktion. Der Unterschied zwischen den Behandlungen war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.4.1 und Grafik 6.4.1).

Tabelle 6.4.1: Farbintensität der positiven Reaktion für die α -SMA-Expression in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

Farbintensität der positiven Reaktion für die α -SMA-Expression / Score		Hydrogel-behandelte Wunden ($n=6=100\%$)	Unbehandelte Kontrollwunden ($n=6=100\%$)
null	Score 0	50%	33.33%
leicht	Score 1	33.33%	50%
mittel	Score 2	16.66%	0%
hoch	Score 3	0%	16.66%
sehr hoch	Score 4	0%	0%



Grafik 6.4.1: Farbintensität der positiven Reaktion für die α -SMA-Expression in % der ausgewerteten Schnitte, $n=6=100\%$ (7-Tages-Gruppe)

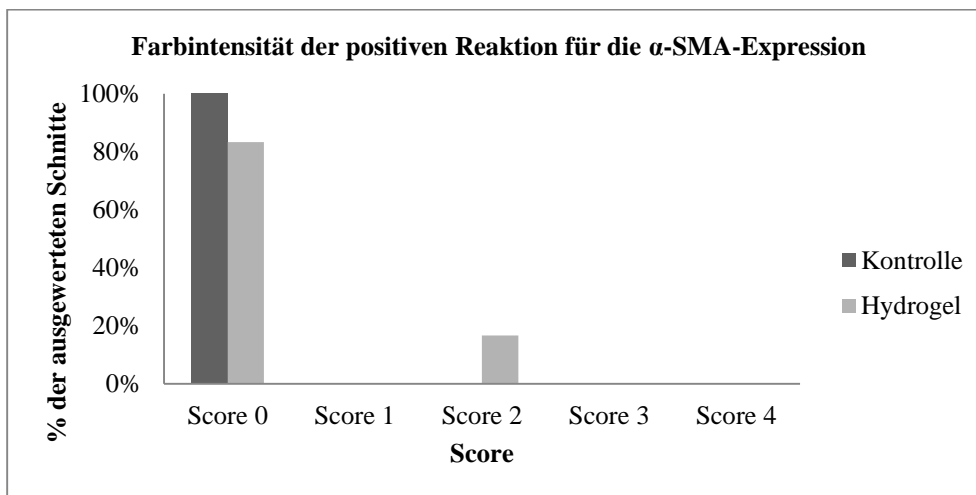
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.4.2. 14-TAGES-GRUPPE

Bei 83.33 % der histologischen Schnitte der Hydrogel-behandelten Wunden (4 Schnitte) zeigte sich keine positive Reaktion auf die immunhistochemische Anfärbung der α -SMA-Expression. Eine mittelgradige Anfärbung dieses Parameters war in 16.66% der Schnitte (1 Schnitt) zu sehen. In keinem der Schnitte der unbehandelten Kontrollwunden wurde eine positive Reaktion auf die immunhistochemische Anfärbung der α -SMA-Expression festgestellt. Der Unterschied zwischen den Behandlungen war nicht signifikant ($p=1$, siehe Tabelle 6.4.2 und Grafik 6.4.2).

Tabelle 6.4.2.: Farbintensität der positiven Reaktion für die α SMA-Expression in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

Farbintensität der positiven Reaktion für die α -SMA-Expression / Score		Hydrogel-behandelte Wunden (n=6=100%)	Unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
null	Score 0	83.33%	100%
leicht	Score 1	0%	0%
mittel	Score 2	16.66%	0%
hoch	Score 3	0%	0%
sehr hoch	Score 4	0%	0%



Grafik 6.4.2: Farbintensität der positiven Reaktion für die α -SMA-Expression in % der ausgewerteten Schnitte, n=6=100% (14-Tages-Gruppe)

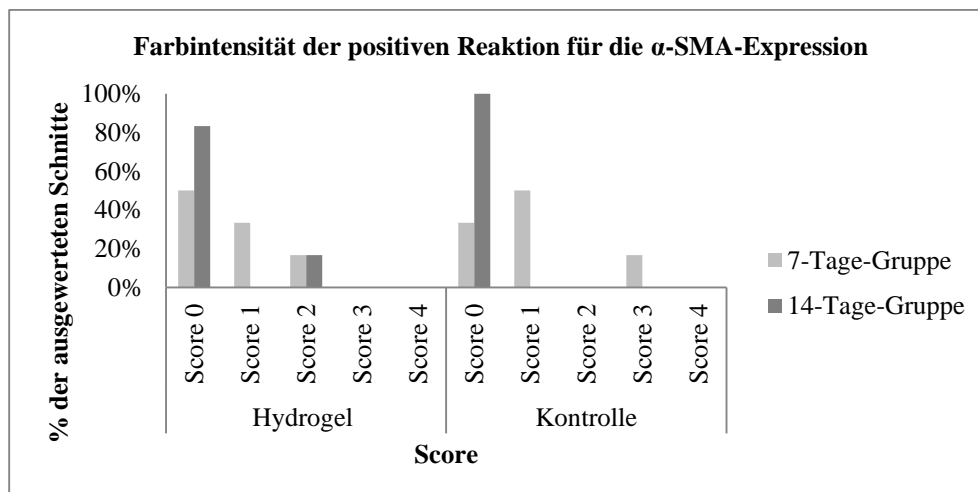
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.4.3. VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Der Vergleich zwischen der 7-Tages-Gruppe und der 14-Tages-Gruppe hinsichtlich der α -SMA-Expression wurde gemacht, um etwaige signifikante Unterschiede der mit Hydrogel behandelten Wunden und der unbehandelten Kontrollwunden im Zeitverlauf aufzudecken.

6.4.3.1. FARBINTENSITÄT DER POSITIVEN REAKTION FÜR DIE α -SMA-EXPRESSION: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7 UND 14 TAGES-GRUPPE

Sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden wurde eine Abnahme der Farbintensität der positiven Reaktion für die α -SMA-Expression über die Zeit beobachtet. Nach 7 Tagen wurde in den mit Hydrogel-behandelten Wunden in 50% (3 Schnitte) keine positive Reaktion beobachtet und in den unbehandelten Kontrollwunden in 50% (3 Schnitte) eine leichte positive Reaktion festgestellt. In den Hydrogel-behandelten Wunden der 14-Tages-Gruppe wurde in 83.33% (5 Schnitte) keine positive Reaktion für die α -SMA-Expression nachgewiesen, in den unbehandelten Kontrollwunden war dies für alle Schnitte so. Der Unterschied zwischen den Anfärbungsmustern an Tag 7 und Tag 14 postoperativ war nicht signifikant (Hydrogel-behandelte Wunden: $p=0.697$, unbehandelte Kontrollwunden $p=0.06061$, siehe Grafik 6.4.3.1).



Grafik 6.4.3.1: Vergleich Farbintensität der positiven Reaktion für die α -SMA-Expression in % der ausgewerteten Schnitte, $n=12=100\%$. Vergleich zwischen der 7-und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.5. HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG: AUSGEMESSENE UND BERECHNETE PARAMETER

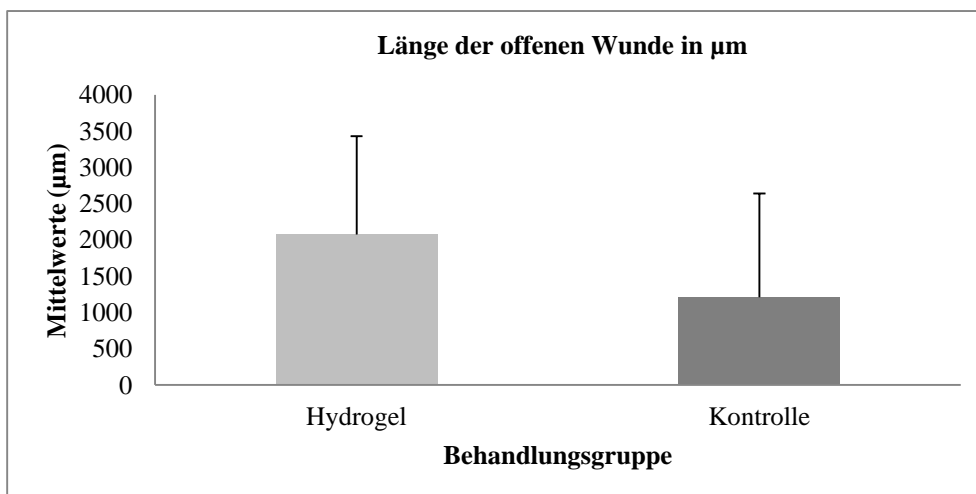
6.5.1. 7-TAGES-GRUPPE

6.5.1.1. LÄNGE DER OFFENEN WUNDE (7-TAGES-GRUPPE)

Die Länge der offenen Wunde entsprach der Länge der nicht epithelisierten Wunde. In den Hydrogel-behandelten Wunden war der Mittelwert der Länge der offenen Wunde 2074.83 μm , mit einer Standardabweichung von 1358.74 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden war der Mittelwert der Länge der offenen Wunde 1212.66 μm und die Standardabweichung betrug 1431.17 μm . Der Unterschied zwischen den Behandlungen war nicht signifikant ($p=0.2169$, siehe Tabelle 6.5.1.1 und Grafik 6.5.1.1).

Tabelle 6.5.1.1: Länge der offenen Wunde (7-Tages-Gruppe)

Länge der offenen Wunde (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	2074.83	1212.66
Standardabweichung	1358.74	1431.17



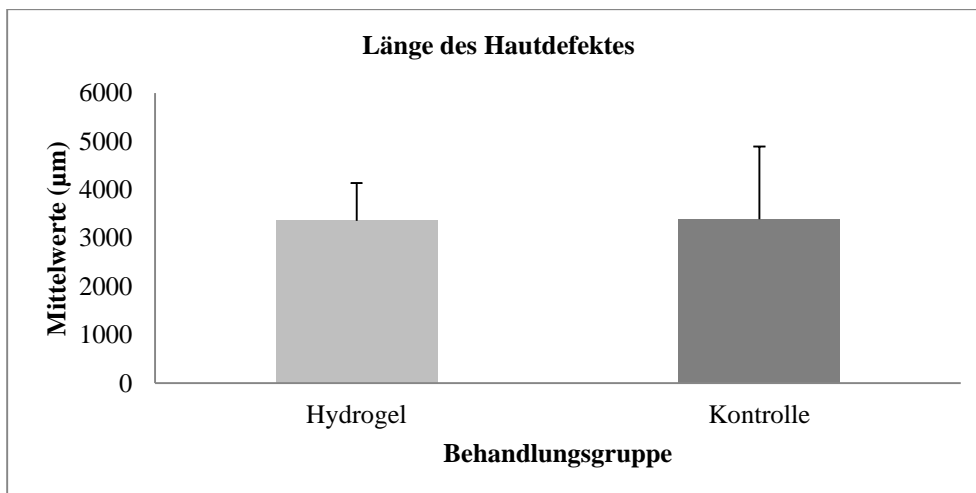
Grafik 6.5.1.1: Länge der offenen Wunde in μm (7-Tages-Gruppe)
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.5.1.2. LÄNGE DES HAUTDEFEKTES (7-TAGES-GRUPPE)

Die Länge des Hautdefektes entsprach der Länge der Wunde zwischen „rechter“ und „linker“ intakter Haut, inklusive des neu gebildeten Epithels. In den Hydrogel-behandelten Wunden war der Mittelwert der Länge des Hautdefektes 3359 μm , mit einer Standardabweichung von 781.51 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden war der Mittelwert 3394.16 μm und die Standardabweichung 1498.99. Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.9398$, siehe Tabelle 6.5.1.2 und Grafik 6.5.1.2).

Tabelle 6.5.1.2: Länge des Hautdefektes (7-Tages-Gruppe)

Länge des Hautdefektes (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	3359	3394.16
Standardabweichung	781.51	1498.99



Grafik 6.5.1.2: Länge des Hautdefektes (7-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

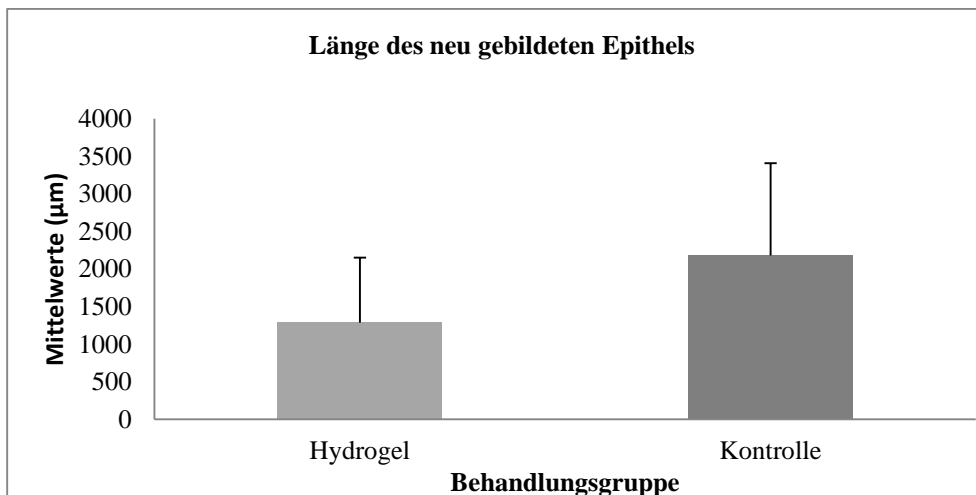
6.5.1.3. LÄNGE DES NEU GEBILDETEN EPITHEL (7-TAGES-GRUPPE)

Dieser Parameter wurde berechnet: Die Länge des neu gebildeten Epithels entsprach der Differenz zwischen der Länge des Hautdefektes und der Länge der offenen Wunde.

In den mit Hydrogel behandelten Wunden war der Mittelwert der Länge des neu gebildeten Epithels 1284.17 μm , mit einer Standardabweichung von 865.02 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden war der Mittelwert 2181.5 μm und die Standardabweichung betrug 1227.29 μm . Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.1378$, siehe Tabelle 6.5.1.3 und Grafik 6.5.1.3).

Tabelle 6.5.1.3: Länge des neu gebildeten Epithels (7-Tages-Gruppe)

Länge des neu gebildeten Epithels (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	1284.17	2181.5
Standardabweichung	865.02	1227.29



Grafik 6.5.1.3: Länge des neu gebildeten Epithels (7-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

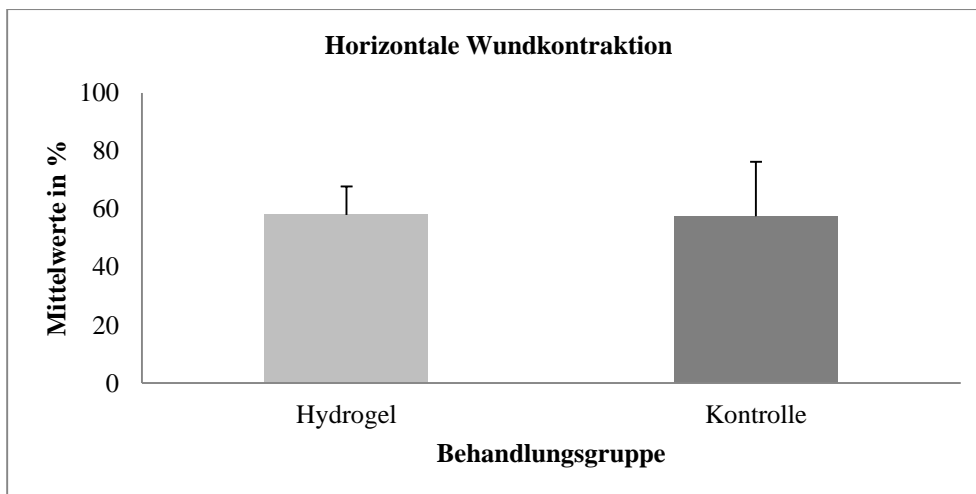
6.5.1.4. HORIZONTALE WUNDKONTRAKTION (7-TAGES-GRUPPE)

Die prozentuale horizontale Wundkontraktion wurde berechnet: Sie entsprach dem prozentualen Verhältnis zwischen dem Durchmesser des Hautdefektes am Operationstag (8 mm) und der am histologischen Schnitt gemessenen Defektlänge.

In den Hydrogel-behandelten Wunden war der Mittelwert der prozentualen horizontalen Wundkontraktion 58.01 %, mit einer Standardabweichung von 9.77 %. In den unbehandelten Kontrollwunden war der Mittelwert 57.57 % und die Standardabweichung 18.73 %. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.8293$, siehe Tabelle 6.5.1.4 und Grafik 6.5.1.4).

Tabelle 6.5.1.4: Horizontale Wundkontraktion (7-Tages-Gruppe)

Horizontale Kontraktionsrate (%)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	58.01	57.57
Standardabweichung	9.77	18.73



Grafik 6.5.1.4: Horizontale Wundkontraktion (7-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

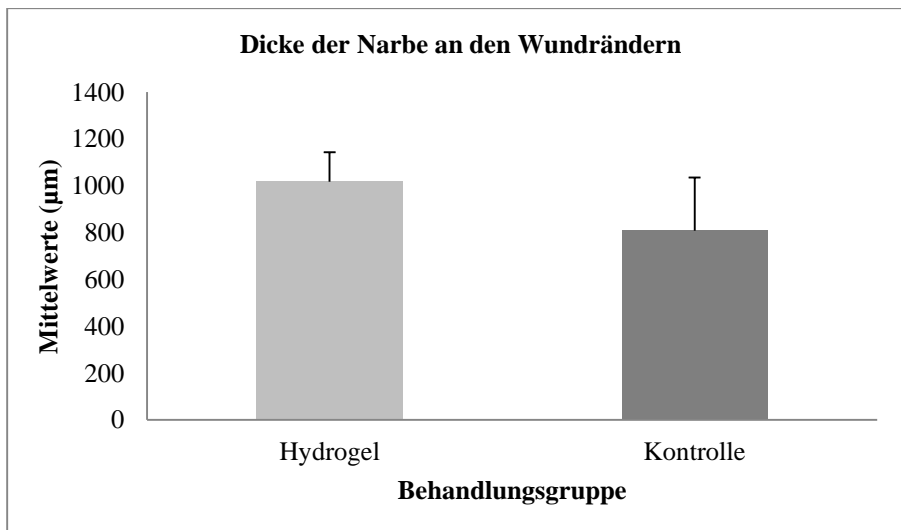
6.5.1.5. DICKE DER NARBE AN DEN WUNDRÄNDERN (7-TAGES-GRUPPE)

Die Dicke der Narbe an beiden sichtbaren Wundrändern wurde an Histoschnitten mittels einer Computersoftware gemessen. Anschliessend wurde der Mittelwert beider Messungen bestimmt.

In den Hydrogel-behandelten Wunden betrug der Mittelwert der Narbendicke an den Wundrändern 1017.08 μm mit einer Standardabweichung von 126.22 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden war dieser Mittelwert 808.42 μm und die Standardabweichung 227.16 μm . Dieser Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war signifikant ($p=0.0246$, siehe Tabelle 6.5.1.5 und Grafik 6.5.1.5).

Tabelle 6.5.1.5: Dicke der Narbe an den Wundrändern (7-Tages-Gruppe)

Dicke der Narbe an den Wundrändern (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	1017.08	808.42
Standardabweichung	126.22	227.16



Grafik 6.5.1.5: Dicke der Narbe an den Wundrändern (7-Tages-Gruppe)

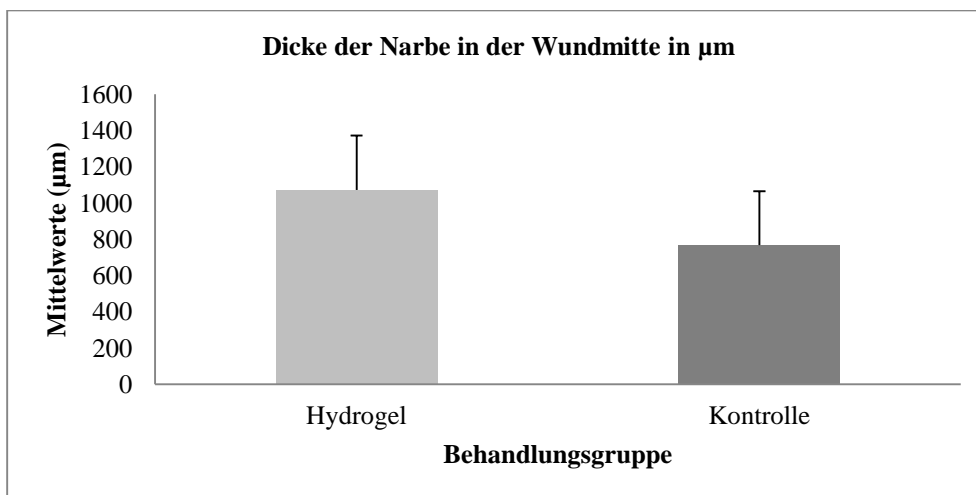
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.5.1.6. DICKE DER NARBE IN DER WUNDMITTE (7-TAGES-GRUPPE)

Die Dicke der Narbe in der Wundmitte wurde an Histoschnitten mittels einer Computersoftware gemessen (Messung von der Narbenoberfläche bis zum darunterliegenden Bindegewebe). In den Hydrogel-behandelten Wunden betrug dieser Wert 1072.5 µm mit einer Standardabweichung von 300.53 µm. In den unbehandelten Kontrollwunden betrug dieser Wert 768.83 µm und die Standardabweichung war 297.50 µm. Der Unterschied zwischen den Behandlungen war signifikant ($p=0.03903$, siehe Tabelle 6.5.1.6 und Grafik 6.5.1.6).

Tabelle 6.5.1.6: Dicke der Narbe in der Wundmitte (7-Tages-Gruppe)

Narbendicke in der Wundmitte (µm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	1072.5	768.83
Standardabweichung	300.53	297.50



Grafik 6.5.1.6: Dicke der Narbe in der Wundmitte (7-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden,

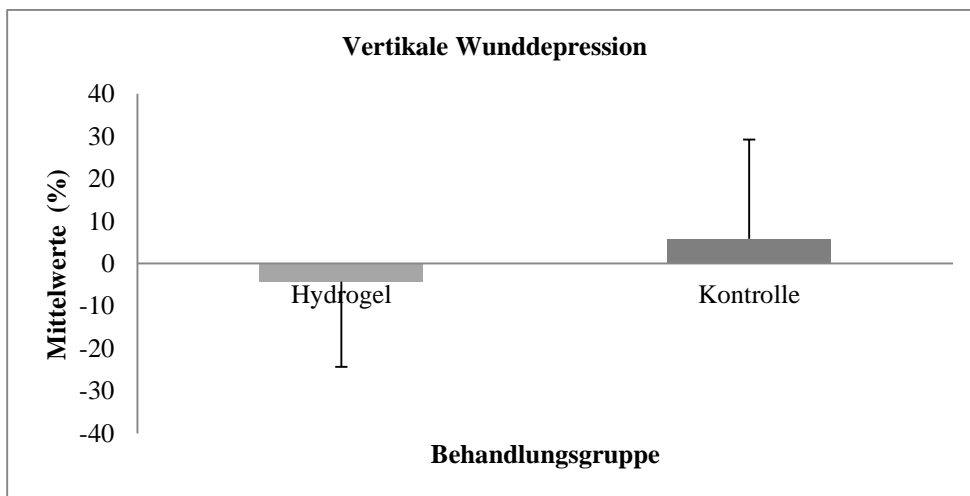
6.5.1.7. VERTIKALE WUNDDEPRESSION (7-TAGES-GRUPPE)

Die prozentuale vertikale Wunddepression entsprach dem prozentualen Verhältnis zwischen der Dicke der Wunde am Rand (Mittelwert aus den Messungen am jeweils rechten und linken Wundrand) und der Dicke der Wunde in der Mitte des Defektes.

In den mit Hydrogel behandelten Wunden war der Mittelwert der prozentualen vertikalen Wunddepression -4.25 % mit einer Standardabweichung von 20.05 %. In den unbehandelten Kontrollwunden war der Mittelwert 5.87 % und die Standardabweichung 23.34 %. Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.4818$, siehe Tabelle 6.5.1.7 und Grafik 6.5.1.7).

Tabelle 6.5.1.7: Vertikale Wunddepression (7-Tages-Gruppe)

Vertikale Wunddepression (%)	Hydrogelbehandelte Wunden (n=6=100%)	unbehandelte Kontrollwunden (n=6=100%)
Mittelwert	-4.25	5.87
Standardabweichung	20.05	23.34



Grafik 6.5.1.7: Vertikale Wunddepression (7-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

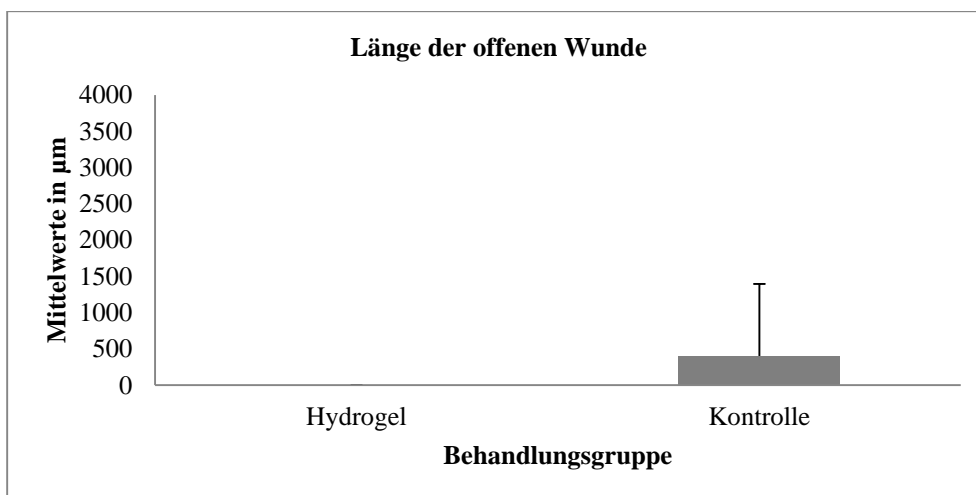
6.5.2. 14-TAGES-GRUPPE

6.5.2.1. LÄNGE DER OFFENEN WUNDE (14-TAGES-GRUPPE)

Die Länge der offenen Wunde entsprach der Länge der nicht epithelisierten Wunde. In den Hydrogel-behandelten Wunden waren alle Wunden geschlossen (Mittelwert 0 μm , Standardabweichung 0 μm). In den unbehandelten Kontrollwunden betrug der Mittelwert 404 μm und die Standardabweichung 989.59 μm . Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.3632$, siehe Tabelle 6.5.2.1 und Grafik 6.5.2.1).

Tabelle 6.5.2.1: Länge der offenen Wunde (14-Tages-Gruppe)

Länge der offenen Wunde (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	0	404
Standardabweichung	0	989.59



Grafik 6.5.2.1: Länge der offenen Wunde (14-Tages-Gruppe)

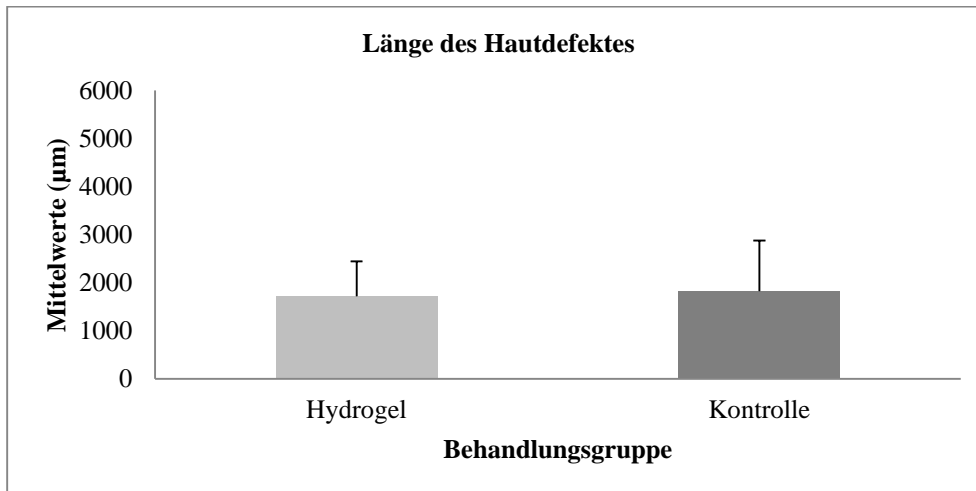
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.5.2.2. LÄNGE DES HAUTDEFEKTES (14-TAGES-GRUPPE)

Die Länge des Hautdefektes entsprach der Länge der Wunde zwischen dem „rechten“ und „linken“ Übergang zur intakten Haut, inklusive des neu gebildeten Epithels. In den Hydrogel-behandelten Wunden betrug dieser Wert 1714 μm mit einer Standardabweichung von 732.76 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden war der Mittelwert 1823 μm und die Standardabweichung 1054.32 μm . Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.8553$, siehe Tabelle 6.5.2.2 und Grafik 6.5.2.2).

Tabelle 6.5.2.2: Länge des Hautdefektes (14-Tages-Gruppe)

Länge des Hautdefektes (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	1714	1823
Standardabweichung	732.76	1054.32



Grafik 6.5.2.2: Länge des Hautdefektes (14-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

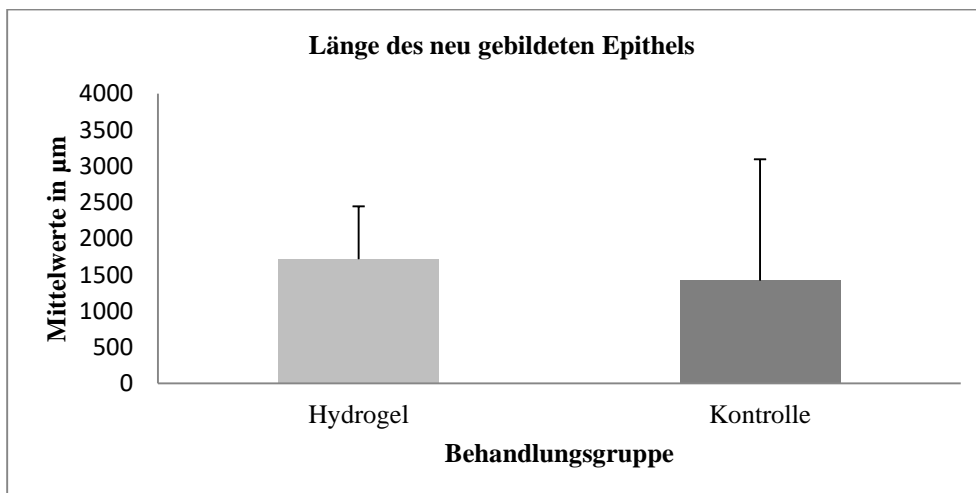
6.5.2.3. LÄNGE DES NEU GEBILDETEN EPITHEL (14-TAGES-GRUPPE)

Die Länge des neu gebildeten Epithels entsprach der Differenz zwischen der Länge des Hautdefektes und der Länge der offenen Wunde.

In den Hydrogel-behandelten Wunden betrug der Mittelwert 1714 μm mit einer Standardabweichung von 732.76 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden war der Mittelwert 1419 μm und die Standardabweichung 1674.96 μm . Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.7212$, siehe Tabelle 6.5.2.3 und Grafik 6.5.2.3).

Tabelle 6.5.2.3: Länge des neu gebildeten Epithels (14-Tages-Gruppe)

Länge des neu gebildeten Epithels (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	1714	1419
Standardabweichung	732.76	1674.96



Grafik 6.5.2.3: Länge des neu gebildeten Epithels (14-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

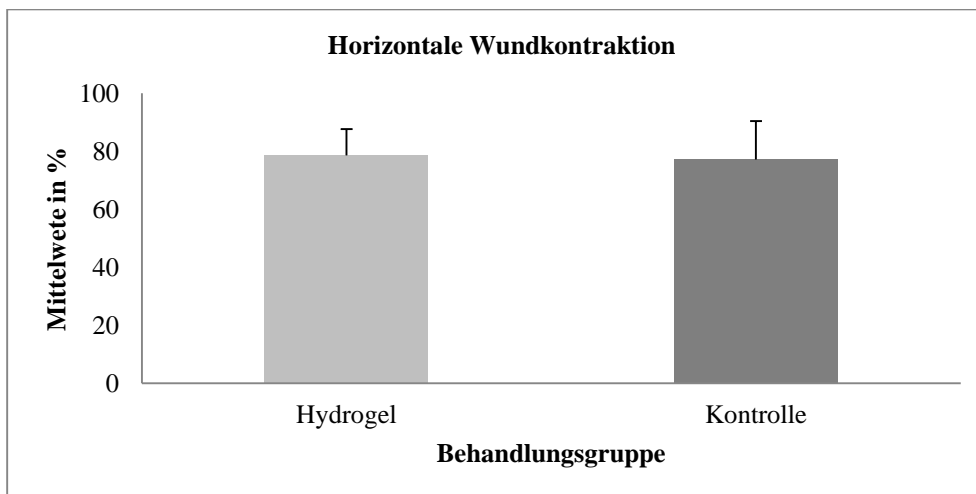
6.5.2.4. HORIZONTALE WUNDKONTRAKTION (14-TAGES-GRUPPE)

Die prozentuale horizontale Wundkontraktion entsprach dem prozentualen Verhältnis zwischen dem Durchmesser des Hautdefektes am Operationstag und der Länge des Hautdefektes am Euthanasietag.

In den Hydrogel-behandelten Wunden war der Mittelwert der horizontalen Wundkontraktion 78.57 % mit einer Standardabweichung von 9.16 %. In den unbehandelten Kontrollwunden betrug der Mittelwert 77.21 % und die Standardabweichung 13.18 %. Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.8554$, siehe Tabelle 6.5.2.4 und Grafik 6.5.2.4).

Tabelle 6.5.2.4: Horizontale Wundkontraktion (14-Tages-Gruppe)

Horizontale Wundkontraktion (%)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	78.57	77.21
Standardabweichung	9.16	13.18



Grafik 6.5.2.4: Horizontale Wundkontraktion (14-Tages-Gruppe)

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

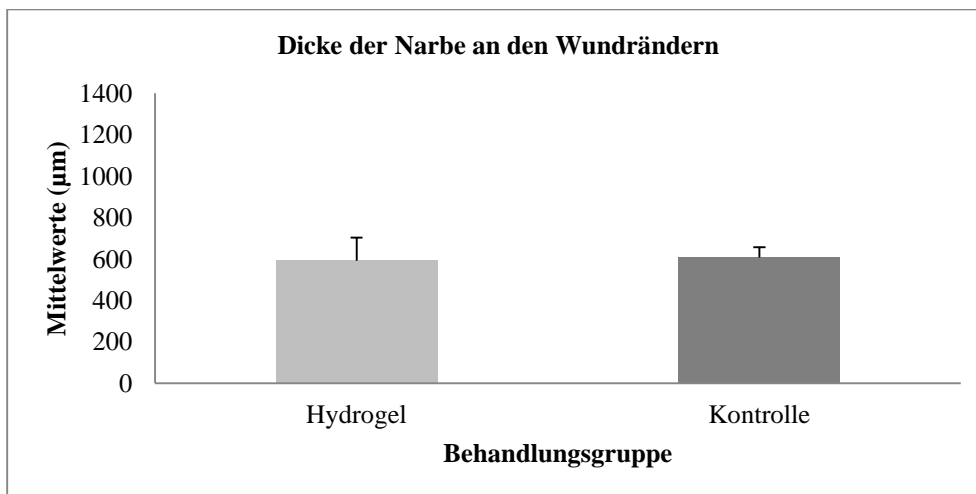
6.5.2.5. DICKE DER NARBE AN DEN WUNDRÄNDERN (14-TAGES-GRUPPE)

Die Dicke der Narbe an den Wundrändern wurde gemessen (Messung von der Narbenoberfläche bis zum darunterliegenden Bindegewebe an beiden Narbenrändern, Mittelwert beider Messungen).

In den mit Hydrogel behandelten Wunden betrug dieser Wert 592.33 μm mit einer Standardabweichung von 111.81 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden betrug der Mittelwert 608.08 μm und die Standardabweichung 48.61 μm . Es wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0.7855$, siehe Tabelle 6.5.2.5 und Grafik 6.5.2.5).

Tabelle 6.5.2.5: Dicke der Narbe an den Wundrändern (14-Tages-Gruppe)

Dicke der Narbe an den Wundrändern (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	592.33	608.08
Standardabweichung	111.81	48.61



Grafik 6.5.2.5: Dicke der Narbe an den Wundrändern (14-Tages-Gruppe)

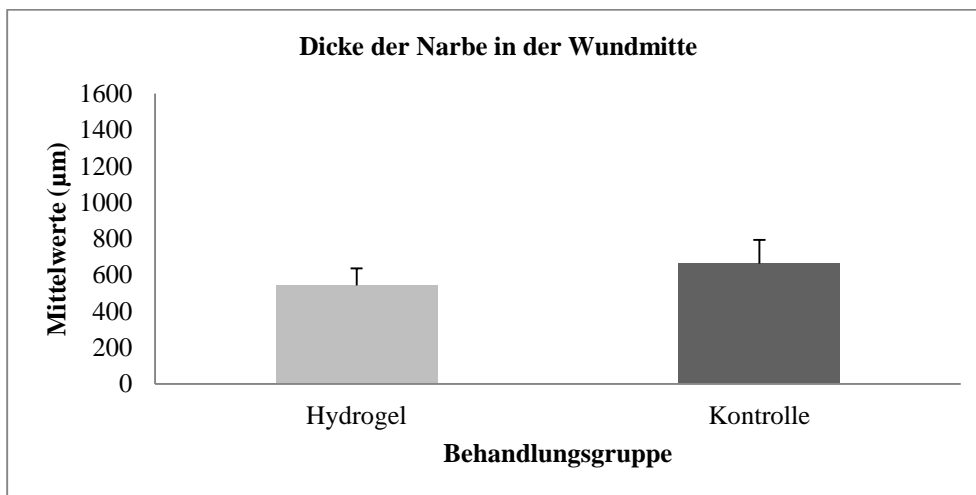
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.5.2.6. DICKE DER NARBE IN DER WUNDMITTE (14-TAGES-GRUPPE)

Die Dicke der Narbe in der Wundmitte wurde gemessen (Messung von der Narbenoberfläche bis zum darunterliegenden Bindegewebe). In den Hydrogel-behandelten Wunden betrug dieser Wert 543.83 μm mit einer Standardabweichung von 92.92 μm . In den unbehandelten Kontrollwunden betrug der Mittelwert 663.5 μm und die Standardabweichung 129.60 μm . Der Unterschied war signifikant ($p=0.009864$, siehe Tabelle 6.5.2.6 und Grafik 6.5.2.6).

Tabelle 6.5.2.6: Dicke der Narbe in der Wundmitte (14-Tages-Gruppe)

Dicke der Narbe in der Wundmitte (μm)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	543.83	663.5
Standardabweichung	92.92	129.60



Grafik 6.5.2.6: Dicke der Narbe in der Wundmitte (14-Tages-Gruppe)
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

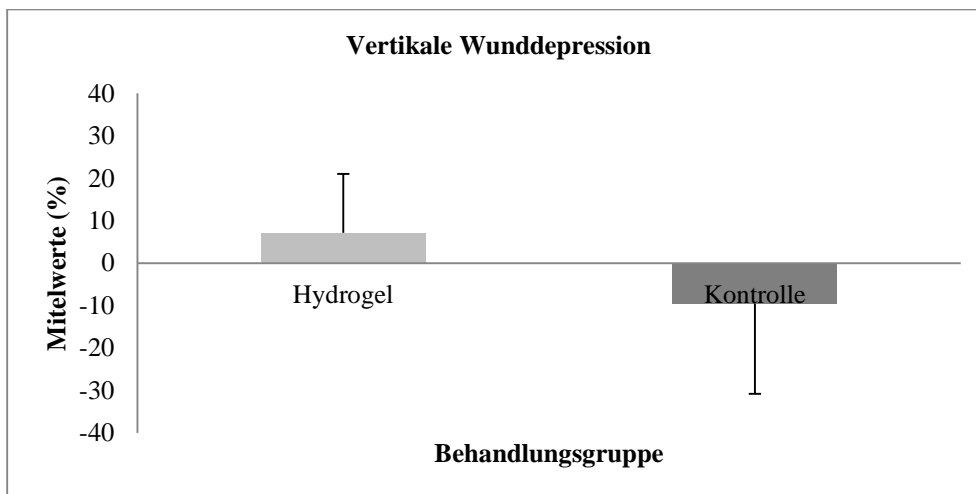
6.5.2.7. VERTIKALE WUNDDEPRESSION (14-TAGES-GRUPPE)

Die prozentuale vertikale Wunddepression entsprach dem prozentualen Verhältnis zwischen der Dicke der Wunde am Rand (Mittelwert aus den Messungen am „rechten“ und „linken“ Rand) und der Dicke der Wunde in der Mitte des Defektes.

In den mit Hydrogel behandelten Wunden betrug der Mittelwert der prozentualen vertikalen Wunddepression 7.16 % mit einer Standardabweichung von 13.83 %. In den unbehandelten Kontrollwunden betrug dieser Wert -9.50 % und die Standardabweichung war 21.32 %. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.09759$, siehe Tabelle 6.5.2.7 und Grafik 6.5.2.7).

Tabelle 6.5.2.7: Vertikale Wunddepression (14-Tages-Gruppe)

Vertikale Wunddepression (%)	Hydrogel-behandelte Wunden	Unbehandelte Kontrollwunden
Mittelwert	7.16	-9.50
Standardabweichung	13.83	21.32



Grafik 6.5.2.7: Vertikale Wunddepression (14-Tages- Gruppe)

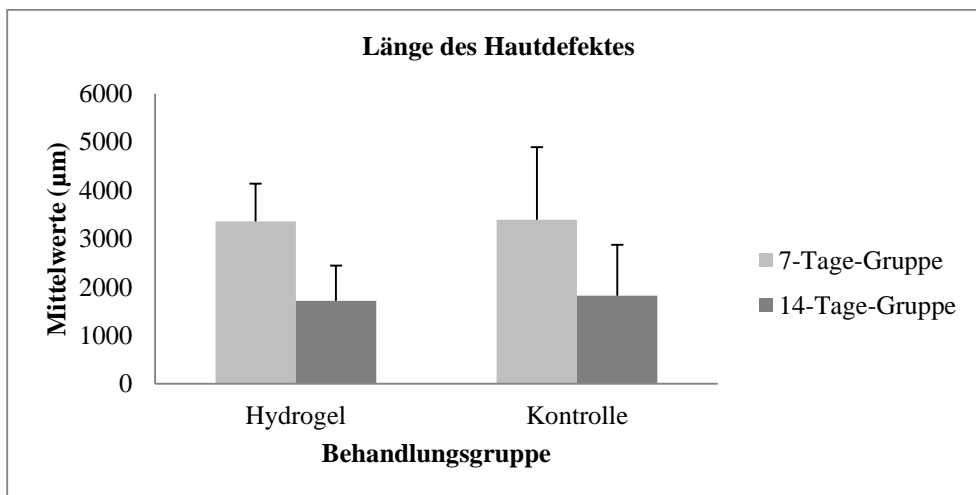
(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.5.3. VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Der Vergleich zwischen der 7-Tages-Gruppe und der 14-Tages-Gruppe hinsichtlich der am histologischen Schnitt ausgemessenen und berechneten Parameter wurde gemacht, um etwaige Unterschiede der mit Hydrogel behandelten Wunden und der unbehandelten Kontrollwunden im Zeitverlauf aufzudecken.

6.5.3.1. LÄNGE DES HAUTDEFEKTES: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7 - UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden wurde der Hautdefekt über die Zeit kleiner. In den Hydrogel-behandelten Wunden wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem 7. und dem 14. Tag ($p=0.0037$, siehe Grafik 6.5.3.1) nachgewiesen, in den unbehandelten Kontrollwunden war der Unterschied auch deutlich sichtbar, aber nicht signifikant ($p=0.0620$, siehe Grafik 6.5.3.1).

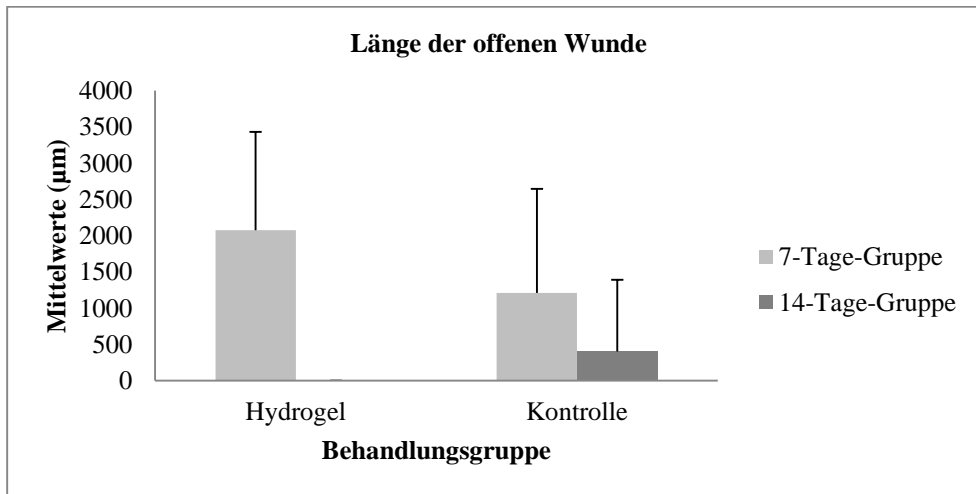


Grafik 6.5.3.1: Länge des Hautdefektes, Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden,

6.5.3.2. LÄNGE DER OFFENEN WUNDE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Die offene Wunde wurde in beiden Behandlungsgruppen über die Zeit kleiner. Die mit Hydrogel behandelten Wunden waren nach 14 Tagen verschlossen. Der Unterschied zur Länge der offenen Wunde an Tag 7 war signifikant ($p=0.0038$, siehe Grafik 6.5.3.2), dieser Unterschied zwischen Tag 7 und Tag 14 war bei den unbehandelten Kontrollwunden nicht signifikant ($p=0.2814$, siehe Grafik 6.5.3.2).

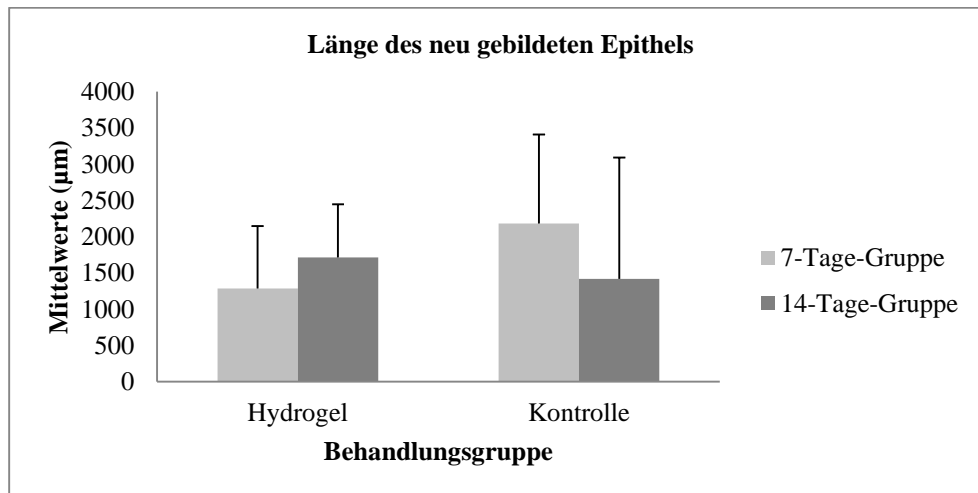


Grafik 6.5.3.2: Länge der offenen Wunde, Vergleich zwischen der 7- und der 14- Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden,

6.5.3.3. LÄNGE DES NEU GEBILDETEN EPITHEL: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

In den Hydrogel-behandelten Wunden nahm die Länge des neu gebildeten Epithels über die Zeit zu. Der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.3749$, siehe Grafik 6.5.3.3). In den unbehandelten Kontrollwunden wurde eine Abnahme der Länge des neu gebildeten Epithels beobachtet. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0.3895$, siehe Grafik 6.5.3.3).

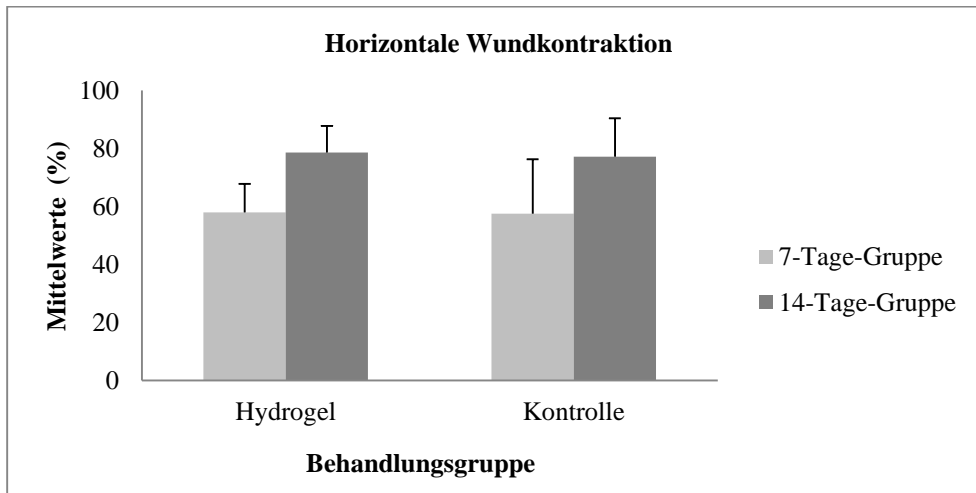


Grafik 6.5.3.3: Länge des neu gebildeten Epithels, Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

6.5.3.4. HORIZONTALE WUNDKONTRAKTION IN %: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Sowohl in den Hydrogel-behandelten Wunden als auch in den unbehandelten Kontrollwunden wurde über die Zeit eine Zunahme der prozentualen horizontalen Wundkontraktion beobachtet. In den Hydrogel-behandelten Wunden war dieser Unterschied signifikant ($p=0.0037$, siehe Grafik 6.5.3.4), nicht jedoch in den unbehandelten Kontrollwunden ($p=0.05881$, siehe Grafik 6.5.3.4).

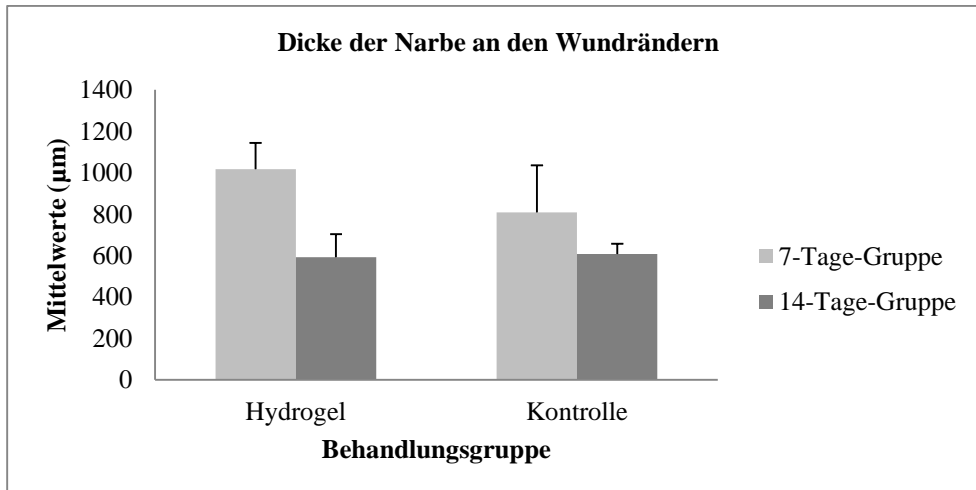


Grafik 6.5.3.4: Horizontale Wundkontraktion, Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden,

6.5.3.5. DICKE DER NARBE AN DEN WUNDRÄNDERN: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Die Dicke der Narbe an den Wundrändern nahm über die Zeit in beiden Behandlungsgruppen ab. In den Hydrogel-behandelten Wunden war dieser Unterschied signifikant ($p=0.0009$, siehe Grafik 6.5.3.5), nicht jedoch in den unbehandelten Kontrollwunden ($p=0.0607$, siehe Grafik 6.5.3.5).

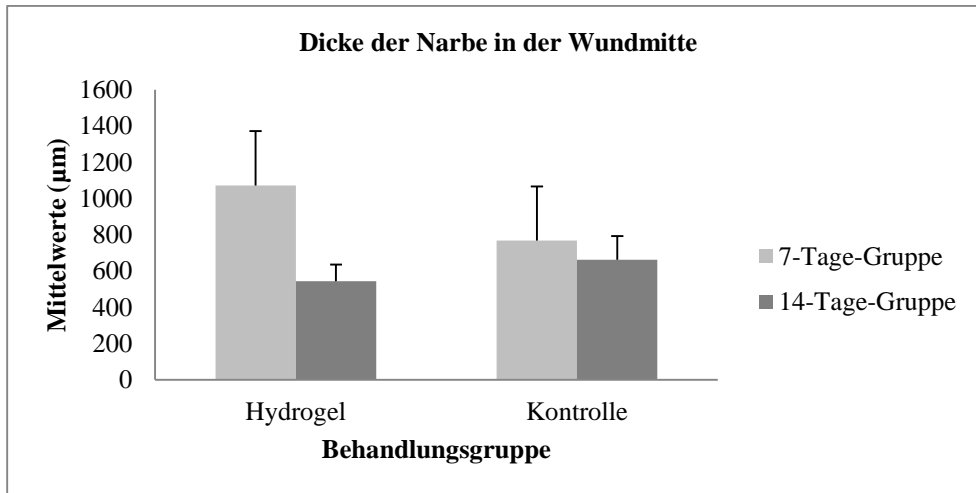


Grafik 6.5.3.5: Dicke der Narbe an den Wundrändern, Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden,

6.5.3.6. DICKE DER NARBE IN DER WUNDMITTE: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

Über die Zeit nahm die Dicke der Narbe in der Wundmitte bei beiden Behandlungsgruppen ab. In den Hydrogel-behandelten Wunden war dieser Unterschied signifikant ($p=0.0020$, siehe Grafik 6.5.3.6), in den unbehandelten Kontrollwunden jedoch nicht ($p=0.4450$, siehe Grafik 6.5.3.6).

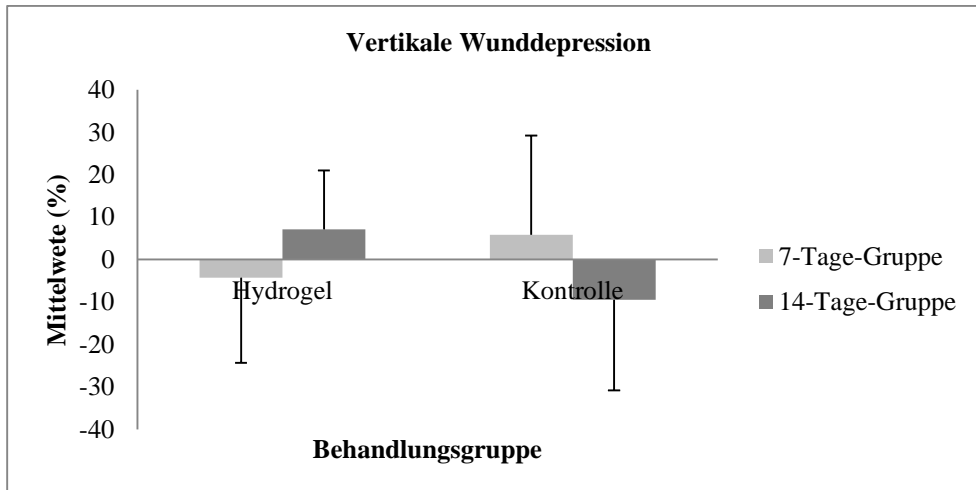


Grafik 6.5.3.6: Dicke der Narbe in der Wundmitte. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden,

6.5.3.7. VERTIKALE WUNDDEPRESSION: VERGLEICH ZWISCHEN DER 7- UND DER 14-TAGES-GRUPPE

In den Hydrogel-behandelten Wunden nahm die prozentuale vertikale Wunddepression über die Zeit zu, der Unterschied war nicht signifikant ($p=0.2779$, siehe Grafik 6.5.3.7). In den unbehandelten Kontrollwunden nahm die prozentuale vertikale Wunddepression über die Zeit ab. Auch dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0.2611$, siehe Grafik 6.5.3.7).



Grafik 6.5.3.7: Vertikale Wunddepression in %. Vergleich zwischen der 7- und der 14-Tages-Gruppe

(„Hydrogel“: Hydrogel-behandelte Wunden, „Kontrolle“: Unbehandelte Kontrollwunden)

7. DISKUSSION

7.1. IN VIVO STUDIE

Ziel dieser preliminären Studie war es, die den Einfluss eines PEG-Fibrinogen Hydrogels als dreidimensionale Reparaturmatrix auf die Wundheilung zu beurteilen. Es wurden bei 6 Ratten standardisierte full-thickness Hautwunden im Rückenbereich erzeugt. Die Ratten wurden anhand der Behandlungszeiten in 2 Gruppen unterteilt, eine 7-Tages-Gruppe und eine 14-Tages-Gruppe. Nach einem standardisierten Behandlungsprotokoll wurden die Wunden entweder mit dem PEG-Fibrinogen Hydrogel behandelt oder blieben unbehandelt. Aussagen über Entzündungsreaktion, Wundverschluss und Narbenbildung wurden anhand histologischer und immunhistologischer Verfahren getroffen, und die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen aufgezeigt.

Vorteile des PEG-Fibrinogen Hydrogels sind, dass es in flüssiger Form appliziert werden und danach durch die Bestrahlung mit UV-Licht in situ in eine Gelform überführt werden kann. Das Hydrogel verbleibt bis zu seiner Resorption in der Wunde, es wird nicht vom Verband absorbiert. Die histologische Auswertung ergab, dass das PEG-Fibrinogen Hydrogel als Matrix resorbierbar und biokompatibel ist und gut in die Wunde integriert wird.

7.1.1. DISKUSSION DER METHODEN

7.1.1.1. DIE RATTE ALS TIERMODELL

Ratten als Tiermodell zu verwenden hat zahlreiche Vorteile. Ratten sind kleine Tiere, die leicht zu halten und zu manipulieren sind. Die Haltungskosten im Vergleich zu grösseren Tieren sind niedrig, da die Tiere in grösseren Gruppen in kleineren Räumen gehalten werden können. Auch im Sinne des 3R Grundsatzes („reduce, replace, refine“) (98) ist diese Spezies hervorragend für Studien geeignet. Aus diesen Gründen werden Wundheilungsmodelle häufig bei Ratten durchgeführt (99, 100), auch da die Wundheilung bei dieser Spezies verhältnismässig schnell abläuft. Dadurch können kürzere Studienzeiten erreicht werden (99). Die Hautmorphologie von Ratten im Vergleich zu anderen Tierarten weist allerdings gewisse Besonderheiten auf. Ratten verfügen über einen zusätzlichen Unterhautmuskel, den panniculus carnosus, der durch Kontraktion und Kollagenbildung an der Wundheilung beteiligt ist. Bei Nagetieren und Kaninchen („loose skinned animals“) erfolgt 90% des Wundverschlusses über Kontraktion (99, 101). Beim Menschen erfolgt die Wundheilung hauptsächlich durch Epithelisation und nur für 25-50% über eine Wundkontraktion (100, 102). Die Rattenhaut hat eine grosse Elastizität und ist nicht fest mit den darunterliegenden Strukturen verbunden (100, 101). Aufgrund dieser anatomischen und funktionellen Unterschiede ist es oft schwierig, die Ergebnisse von Wundheilungsstudien an Ratten auf andere Spezies zu übertragen. Mehrere klinische Studien haben jedoch bewiesen, dass der Ablauf der Wundheilung ein relativ homogener Prozess ist, der für die verschiedenen Spezies ähnlich abläuft (103). Aus diesem Grund und auch deswegen, weil es hier vor allem um den grundsätzlichen Beweis um den Hydrogel als geeignete Matrix ging wurde für die vorliegende Preliminärstudie die Ratte als Tiermodell gewählt. Für weitere Studien mit funktionalisierten Hydrogelen sollten grössere Versuchstiere, wie z.Bsp. für die Haut klassisch herbeigezogene Minipigs, verwendet werden.

7.1.1.2. **DIE AKUTE EXCISIONALE FULL-THICKNESS WUNDE ALS MODELL FÜR KLINISCHE HAUTWUNDEN**

In der vorliegenden Studie wurden am Rücken der Tiere 8 mm grosse Wunden hergestellt, die sowohl die Haut als auch die Subkutis betrafen. Dafür wurde eine 8 mm Biopsiestanze verwendet. Das PEG-Fibrinogen Hydrogel wurde damit auf einer iatrogenen, sauberen Wunde standardisierter Grösse getestet. Die runde Form wurde verwendet, da in der Literatur beschrieben ist, dass zirkuläre Wunden langsamer heilen und stärker kontrahieren als viereckige oder dreieckige Hautwunden mit einem entsprechend schlechteren kosmetischen Ergebnis (28-32).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Hydrogele als Wundauflage in komplizierten und schlecht heilenden (infizierte Wunden, Verbrennungswunden, Hautulcera, chronische nicht heilende Wunden) Hautwunden mit Erfolg eingesetzt wurden (47, 50, 55-57).

7.1.1.3. **OPERATION UND POSTOPERATIVE PHASE**

Die Adaptation der Ratten, die Narkose, der chirurgische Eingriff sowie die Aufwachphase verliefen komplikationslos. Die Anwendung von PEG-Fibrinogen Hydrogel wurde vor der Implantation aktiviert und in flüssiger Form in die Wunde gegeben. Durch eine UV Lampe wurde das flüssige Hydrogel in eine Gelform umgewandelt. In 2 Wunden musste die Behandlung wiederholt werden, da das Hydrogel vor der Gelierung aus der Wunde geflossen war.

Bei 2 Ratten war ein wiederholter Verbandswechsel unter Narkose notwendig (1 Tag beziehungsweise 2 Tage postoperativ), da die Verbände von den anderen Ratten angenagt wurden. Diese beiden Ratten wurden danach alleine gehalten. Die restlichen Verbände wurden gut toleriert, die Ratten zeigten in der postoperativen Phase keine Stressanzeichen wie Porphyrin-Augenausfluss. Das Benagen der Verbände erfolgt meist nicht durch die Ratte selber, sondern durch Käfiggenossen. Dies könnte nur durch eine Einzelhaltung verhindert werden, die aber tierschutzrechtlich bedenklich ist.

▪ Behandlungszeiten und Behandlungsgruppen

Wegen der kleinen Zahl an Tieren sind die Ergebnisse nur bedingt statistisch auswertbar. Die grosse Varianz zwischen den Proben beeinträchtigt zusätzlich eine genaue Statistik. Zusätzlich diente jede Ratte selber als negative Kontrolle, was intraindividuelle Bias verursachen könnte. Die Entnahme von Biopsien an mehreren Zeitpunkten würde die Genauigkeit der Studienergebnisse wahrscheinlich verbessern. Da es sich aber um eine Preliminärstudie handelt, die zunächst nur nachweisen soll, dass das eingebrachte Material keine negativen Einflüsse auf die Wundheilung hat, ist die geringe Tierzahl gerechtfertigt.

Die Behandlungszeiträume betrugen 1 bzw. 2 Wochen. Der erste Untersuchungszeitraum von sieben Tagen wurde gewählt, damit die Effekte von PEG-Fibrinogen Hydrogel während der Proliferations-Granulationsphase untersucht werden konnten. Diese Phase zeichnet sich durch Angiogenese, Kollagenproduktion, Wundkontraktur und Wundverschluss aus, dabei spielen Endothelzellen, Epithelzellen, Makrophagen und Fibroblasten eine wichtige Rolle (20, 104). Die Beurteilung dieser Parameter in der Proliferationsphase ist von grösster Bedeutung bei der Bewertung einer Wundauflage. Nach 14 Tagen, dem Zeitpunkt der Euthanasie der zweiten Gruppe beginnt die Remodellierungs-Reifungsphase, in der die Ausreifung des Granulationsgewebes besonders gut beobachtet werden kann. Verzögerungen der Heilung und

Reifung wären hier sichtbar gewesen, die aber in keiner der Wunden auftraten. Nach 14 Tagen war die Mehrheit der Wunden verheilt und das Narbengewebe war gut sichtbar.

Untersuchungsmethoden und Probenauswertung

▪ Histologische Auswertung

Die standardisierte und genau definierte Aufarbeitung der Proben im Labor verlief schnell und problemlos. Alle zu untersuchenden Hautwunden wurden im Bereich des grössten Durchmessers geteilt und untersucht. Bei der 14-Tages-Gruppe war es häufig schwierig, die genaue Mitte zu treffen, da die Narben wegen der stattgefundenen Wundkontraktur in Form und Grösse nicht den ursprünglichen Wunden entsprachen. Die Beurteilung von Entzündungsreaktion und Wundheilungsparametern war an den Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten leicht möglich.

▪ Immunhistologische Auswertung

Ziel der immunhistologischen Untersuchung war eine quantitative Beurteilung der α -SMA Expression als Marker für die Myofibroblastenproliferation. Während der Wundheilung werden die Fibroblasten unter dem Einfluss von mechanischem Stress, TGF- β und zellulärem Fibronectin zu Myofibroblasten umgewandelt. Im Gegensatz zu Fibroblasten verfügen die Myofibroblasten über kontraktile Eigenschaften und synthetisieren zudem Kollagen Typ 1 und Typ 3 (105). Ihre Mikrofilamente enthalten α -SMA (106), es besteht eine positive Korrelation zwischen α -SMA Expression und Wundkontraktion (107). Die Kontraktion der Wundränder ist ein wichtiger und unerlässlicher Vorgang in der Wundheilung da auf diese Weise die Wundgrösse reduziert werden kann (105). Im Laufe einer physiologischen Wundheilung bewirkt die Apoptose von Myofibroblasten das Verschwinden von nachweisbarem α -SMA, im allgemeinen dann, wenn die Epithelisation abgeschlossen ist (108). Die Nachweisbarkeit von α -SMA ist stark spezieabhängig. Eine längere Expression von α -SMA kann ein Hinweis auf Wundheilungskomplikationen sein.

Weitergehende Aussagen über den Heilungsverlauf hinsichtlich der Qualität und Quantität des Kollagens und der Epithelisierung wären durch immunhistochemische Färbungen möglich, die TGF- β 3, Kollagen 1 und 3, Faktor 8 und Fibronectin nachweisen.

7.1.2. DISKUSSION DER RESULTATE

▪ Histologie

Sowohl in der 7- als auch in der 14-Tages-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der untersuchten Parameter (**Anzahl von Entzündungszellen, Materialreste, Reife des Bindegewebes, Angiogenese, Vorhandensein einer Basalmembran und von Haarfollikeln**) zwischen den beiden Behandlungsmethoden nachgewiesen. Dies zeigt, dass die physiologische Entzündungsphase in der Wundheilung durch das Hydrogel nicht negativ beeinflusst wurde.

Um zu sehen, wie sich die Wunden im Zeitverlauf änderten, wurden die Werte der untersuchten Parameter am 7. Tag mit denen am 14. Tag verglichen. Hier fanden sich signifikante Unterschiede bei den Parametern „**Granulozyten in der Wundmitte** ($p=0.0368$)“ und „**Makrophagen in der Wundmitte** ($p=0.02597$)“. Bei beiden Behandlungsgruppen nahmen die genannten Zellen zwischen dem 7. und dem 14. Tag physiologischerweise ab, jedoch nur in den unbehandelten Kontrollwunden war dieser Unterschied signifikant, wobei allerdings die Zellzahl in den unbehandelten Kontrollwunden am 7. Tag deutlich höher war als bei den Hydrogel behandelten Wunden, sodass die

Reduzierung der Zellzahl bis zum 14. Tag deutlicher ausfiel. Dieser Unterschied könnte schlicht darauf zurückzuführen sein, dass im Hydrogel die Zellen zum einen anfänglich etwas weniger schnell einwandern und bei der Heilung auch wieder weniger schnell abwandern können. Das Auftreten von Neutrophilen und Makrophagen in der Wunde findet vorwiegend in der Entzündungsphase statt (22). Wie ausgeprägt und wann genau eine Reduktion der Entzündungszellen zu erwarten ist, ist individuell und vor allem speziesabhängig sehr unterschiedlich. Generell ist es schwierig, die Grenze zwischen physiologischer oder pathologischer Entzündung zu ziehen.

Die Anzahl der **Blutgefässe** zeigte eine signifikante Reduktion sowohl bei den mit Hydrogel behandelten Wunden ($p=0.006494$) als auch bei den unbehandelten Kontrollwunden ($p=0.006494$) zwischen dem 7. und dem 14. Tag. Dieser Befund bildet den physiologischen Verlauf der Angiogenese in der Wundheilung ab (109), bei dem zunächst viele neue Gefässe im Granulationsgewebe entstehen, die sich nach erfolgter Heilung wieder zurückbilden. Im Gegensatz zu den Entzündungszellen bestanden hier zwischen den Gruppen keine Unterschiede. Ob das unter anderem mit der Grösse der Zellen zusammen hängt ist rein spekulativ zu diesem Zeitpunkt. Blutgefässzellen sind kleiner als Makrophagen und werden vielleicht weniger behindert in der Motilität als die grösseren Entzündungszellen.

In den Hydrogel-behandelten Wunden fand eine signifikante Verbesserung ($p=0.0086$) der **Bindegewebsreifung in der Wundmitte zwischen dem 7. und dem 14 Tag** statt. Das Hauptausmass der Reifung des Granulationsgewebes liegt offensichtlich in diesem Zeitraum (20, 21, 25, 26). Hier zeigt sich ein möglicher Vorteil des Hydrogels, indem die Struktur des Gels von Anfang an eine gleichmässige Struktur für die einwandernden Fibroblasten und Blutgefässe bietet, welche sich dann in einer schnelleren Maturierung des Gewebes niederschlägt.

Reste des applizierten Hydrogels konnten in wenigen der Schnitte der 7-Tages-Gruppe gefunden werden, in keinem Fall wurde es in den Schnitten der 14-Tages-Gruppe nachgewiesen. Offensichtlich erfolgt die komplette Degradierung des Materials vor dem 14. postoperativen Tag. Der Aufbau des neuen Hautgewebes und der Abbau des Materials scheinen dabei zeitlich gut Hand in Hand zu gehen.

Zu Beginn der Studie wurde geprüft, ob das PEG-Hydrogel nach dem Gelieren von Verbandsmaterial angesaugt wird. Das war, im Gegensatz zu den üblichen flüssigen Hydrogels, nicht der Fall. Dieser Umstand ist als einer der grossen Vorteile des Materials anzusehen, da es bis zu seiner Degradation in der Wunde verbleibt und damit über einen längeren Zeitraum als Gerüst für die Einsprossung von Zellen dienen kann und zusätzlich mechanischen Belastungen standhält, die insbesondere bei Wunden über Knochen und Gelenken auftreten können (28-32).

▪ Immunhistologie

Sowohl in der 7-Tages-Gruppe als auch in der 14-Tages-Gruppe wurde bezüglich der **Expression von α -SMA** kein signifikanter Unterschied zwischen den Hydrogel-behandelten Wunden und den unbehandelten Kontrollwunden festgestellt. Eine sehr starke oder über den üblichen Zeitraum hinausgehende Expression von α -SMA wäre ein Indikator für eine übermässige Anzahl von Myofibroblasten und damit eine verlängerte oder stärkere Wundkontraktion. Generell ist die Wundkontraktion zwar vorteilhaft, da sie die Wundfläche verkleinert und damit die Heilungszeit verkürzt, da eine kleinere Fläche epithelisiert werden muss. Vorwiegend ist die isometrische Spannung auf der Wunde für die α -SMA-Expression und die Entwicklung von kontraktilen Eigenschaften verantwortlich (110-113). Sobald die Kontraktion jedoch über das normale Mass hinausgeht und zu einer Kontraktur führt, hat dies

mehrheitlich negative Effekte, da das Ersatzgewebe weniger elastisch ist und bei Wunden über Gelenken zu einer deutlichen Bewegungseinschränkung führen kann. Andere Studien zeigten, dass die α -SMA-Expression bei Ratten mit ungestörter Wundheilung zwischen dem 3. und 7. Tag sichtbar ist und dann wieder verschwindet. In der vorliegenden Studie wurde kein signifikanter Unterschied in der α -SMA Expression zwischen den unbehandelten Kontrollwunden und den Hydrogel-behandelten Wunden nachgewiesen. Das Hydrogel hat die Produktion von TGF- β 1 offensichtlich weder erhöht noch erniedrigt, ein Indikator für eine ungestörte der physiologischen entsprechenden Wundheilung. Es wäre interessant, andere Myofibroblasten-Marker wie F-actin, EDA FN, TGF- β 1 und TGF- β -RII immunhistologisch zu ermitteln (114), um genauere Aussagen über den Heilungsverlauf hinsichtlich Angiogenese, Qualität und Quantität des Kollagens und Epithelisierung treffen zu können. In dieser Studie wurde darauf verzichtet, weil die Unterschiede der α -SMA-Expression zu gering waren um die zusätzlichen Kosten zu rechtfertigen.

▪ Ausgemessene und berechnete Parameter

Nach 7 Tagen war bei den Hydrogel-behandelten Wunden die Schicht des Granulationsgewebes am Wundrand und in der Wundmitte signifikant dicker als die der unbehandelten Kontrollwunden (**Dicke der Narbe an den Wundrändern** der Hydrogel-behandelten Wunden ($p=0.0246$) und **Dicke der Narbe in der Wundmitte** der Hydrogel-behandelten Wunden ($p=0.03903$)). Es kann postuliert werden, dass eine grössere Menge Granulationsgewebe die Wundheilung per se vorteilhaft beeinflusst. Das PEG-Fibrinogen Hydrogel bildet eine extrazelluläre Matrix als Gerüst, das die Zellmigration aus der Wundumgebung positiv beeinflusst/stimuliert und damit die Bildung von Granulationsgewebe fördert. So bildet sich schon früh ein belastbarer Untergrund für die Epithelisierung des Defektes. Die Parameter „**Länge des Hautdefektes**“, „**Horizontale Wundkontraktion**“, „**Vertikale Wunddepression**“, „**Länge des neu gebildeten Epithels**“, und „**Länge der offenen Wunde**“ zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hydrogel-behandelten Wunden und den unbehandelten Kontrollwunden. Offensichtlich hat das Hydrogel keinen Einfluss auf diese Faktoren.

In der 14-Tages-Gruppe konnte hingegen gezeigt werden, dass die **Dicke der Narbe in der Wundmitte** der Hydrogel-behandelten Wunden signifikant kleiner war als bei den unbehandelten Kontrollwunden ($p=0.0098$). Offensichtlich fördert das Hydrogel vor allem in der frühen Phase der Wundheilung die Bildung von Granulationsgewebe und bei den unbehandelten Wunden erfolgt der Zuwachs vor allem in der zweiten beobachteten Phase. In jedem Falle konnte jedoch beobachtet werden, dass die Dicke der Narbe über die Zeit bei den Hydrogelen gleichmässiger war als bei den Kontrollen. Für Wunddefekte könnte das einen qualitativen Vorteil bringen, indem bei Hautdefekten die Wunddepression schliesslich weniger ausgepägt und die Hautdicke nach Abheilung ähnlicher der umliegenden Haut zu liegen kommt. Kosmetisch wäre das vor allem im Gesichtsbereich ein sehr wichtiger Aspekt, da beim Menschen gerade z.Bsp. bei Hautverletzungen an der Stirne diese Wunddepressionen sehr unschön auffallen.

Bei den Parametern „**Länge des Hautdefektes**“, „**Horizontale Wundkontraktion**“, „**Vertikale Wunddepression**“, „**Länge des neu gebildeten Epithels**“, „**Länge der offenen Wunde**“ und „**Dicke der Narbe am Wundränder**“ konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Hydrogel-behandelten Wunden und der unbehandelten Kontrollwunden nachgewiesen werden. Die Ergebnisse in der **Immunhistologie** sind entsprechend. Dies lässt vermuten, dass das Hydrogel die Epithelisierung der Wunde und ihre allgemeine Heilung nicht beschleunigt oder verlangsamt hat. Mittels immunhistologischer Untersuchung von TGF $\beta 3$ könnte wahrscheinlich eine genauere Aussage über die Bindegewebsentstehung, die Angiogenese und die Narbenbildung getroffen werden (119-121).

Im Vergleich der Entwicklung über die Zeit zeigt sich, dass sich die Werte des 7- und des 14-Tages Zeitpunktes für die Hydrogel-behandelten Wunden in folgenden Parametern signifikant unterschieden: „**Länge des Hautdefektes**“ ($p=0.0037$)“, „**Länge der offenen Wunde**“ ($p=0.0038$)“, „**Dicke der Narbe an den Wundrändern**“ ($p=0.0009$)“, „**Dicke der Narbe in der Wundmitte**“ ($p=0.0020$)“ und „**Horizontale Wundkontraktion**“ ($p=0.0037$)“.

Bei dem Parameter „**Länge des Hautdefektes**“ gab es einen Unterschied zwischen den Behandlungen. Alle Hautwunden verkleinerten sich zwischen dem 7. und dem 14. Tag. Der Unterschied war bei den Hydrogel-behandelten Wunden signifikant ($p=0.0037$) bei den unbehandelten Kontrollwunden jedoch nicht ($p=0.06207$).

Für den Parameter „**Länge der offenen Wunde**“ zeigte sich das gleiche Bild, der Unterschied war nur bei den Hydrogel-behandelten Wunden signifikant ($p=0.0038$), bei den unbehandelten Wunden nicht. Allerdings ist die Standardabweichung am 7. und am 14. Tag

bei den unbehandelten Kontrollwunden fast doppelt so hoch wie bei den Hydrogel-behandelten Wunden. Das bestärkt die oben bei der Narbendicke angebrachte Vermutung, dass die Wundheilung mit dem Hydrogel als Matrix gleichmässiger und damit voraussehbarer abläuft als bei den Kontrollen, welche eher etwas dem Zufall überlassen ist.

In dieser Studie wurde nach 7 Tagen eine **Wundkontraktion** von etwa 58% und nach 2 Wochen von rund 78% gesehen. Diese Kontraktionen waren bei beiden Gruppen gleich und kleiner als in der Literatur beschrieben (99, 101). In dieser Studie könnte die verminderte Wundkontraktion ebenfalls, wie in der Literatur beschrieben (28-32), durch die zirkuläre Form bedingt sein. Im Laufe der Zeit wurde eine signifikante Zunahme der **horizontalen Wundkontraktion** in der Hydrogel-behandelten Wunden nachgewiesen ($p= 0.0037$), nicht aber in der unbehandelten Kontrollwunden.

Schlussfolgerung und Empfehlungen

Die erste Hypothese dieser Preliminärstudie konnte bestätigt werden. PEG-Fibrinogen Hydrogel in flüssiger Form war gutverträglich und konnte in eine Hautwunde appliziert und durch Bestrahlung mit UV-Licht polymerisiert werden.

In der vorliegenden Studie konnte die Biokompatibilität und die Resorbierbarkeit von PEG-Fibrinogen Hydrogel auf Hautwunden bei Ratten nachgewiesen werden und somit ein Teil der zweiten Hypothese (das PEG-Fibrinogen Hydrogel ist resorbierbar und biokompatibel) bestätigt werden. Dieses PEG-Fibrinogen Hydrogel wurde bereits *in vitro* (6, 9-14) und *in vivo* im Knochen (15), im Herz (16,17) und in Muskeln (18) eingesetzt. Dass die Hydrogel-behandelten Wunden nach 7 Tagen eine dickere Schicht Granulationsgewebe sowohl in der Wundmitte als auch an den Wundrändern aufwiesen, spricht für einen stärkeren und stabileren Aufbau der Narbe. Dies ist z.B. über Knochen oder Sehnen als vorteilhaft anzusehen, da sie einerseits eine gute mechanische Barriere darstellt und andererseits viel Granulationsgewebe enthält, was in diesen besonderen empfindlichen Körpergegenden einen guten sowohl mechanischen als auch immunologischen Abwehrmechanismus gewährleistet. Eine Beschleunigung der Epithelisierung wurde allerdings mit dem Hydrogel alleine nicht erzielt. Im nächsten Schritt wäre eine Beschichtung des Hydrogels mit spezifischen wundheilungsfördernden Substanzen wie zum Beispiel diversen Zytokinen (VEGF (115), EGF (116) bFGF (117) oder spezifischen gefäßbildenden codierenden Plasmiden DNA (118) interessant. Alle diese Substanzen haben einen positiven Effekt auf die Wundheilung. Es ist auch von Interesse, dieses Hydrogel bei anderen Tierarten, über längere Behandlungszeiten oder mittels zusätzlichen Untersuchungsmethoden zu testen. „Gewebe Engineering“ und die Applikation von spezifischen Hydrogelen auf „schwierige“ Wunden bieten eine viel versprechende Perspektive auf der Suche nach der idealen Wundbehandlung.

7.1.3. LIMITIERUNG DER STUDIE

Da in wenigen Fällen die Verbände durch die Tiere selbst oder durch Käfiggenossen angenagt wurden, ist eine Beeinträchtigung der Heilung nicht ganz auszuschliessen. Die Rattenhaut unterscheidet sich von anderen Spezies. Schlussfolgerungen aus dieser Studie dürfen nicht 1:1 auf andere Spezies übertragen werden, obwohl klinischen Beobachtungen gezeigt haben, dass der Wundheilungsverlauf ein relativ homogener Vorgang ist (103). Zurzeit stehen keine validierten Auswertungssysteme hinsichtlich histologischer Parameter für die Wundheilung bei Ratten zur Verfügung, die verwendeten Verfahren geben jedoch trotzdem eine gute Übersicht über die Reaktion der Wunde auf die Applikation des Gels.

Die Biokompatibilität des verwendeten Gels wurde in dieser Präliminärstudie bewiesen. Weitere Studien mit grösseren Tierzahlen, anderen Versuchstieren (z.B. Schwein), anderen Wundtypen (z.B. infizierte Wunden, Brandwunden) werden folgen. Die histologische Auswertung könnte dann um zusätzliche immunhistologische Untersuchungen erweitert werden, wie z.B. TGF- β 3, Kollagen 1 und 3, Faktor 8 und Fibronektin.

8. LITERATURVERZEICHNIS/REFERENZEN

1. **Ovington, L. G.:** Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology*, 25(1): 33-8, 2007.
2. **Seliktar, D.:** Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. *Science*, 336(6085): 1124-28, 2012.
3. **Lee, K. Y.; Mooney, D. J.:** Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*, 101(7): 1869–80, 2001.
4. **Appelman, T. P.; Mizrahi, J.; Elisseeff, J. H.; Seliktar, D.:** The influence of biological motifs and dynamic mechanical stimulation in hydrogel scaffold systems on the phenotype of chondrocytes. *Biomaterials*, 32(6): 1508-16, 2011.
5. **Roberts, M. J.; Bentley, M. D.; Harris, J. M.:** Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(4): 459-76, 2002.
6. **Almany, L.; Seliktar, D.:** Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials*, 26(15): 2467-77, 2005.
7. **Burdick, J. A.; Prestwich, G. D.:** Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials*, 23(12): H41-56, 2011.
8. **Bhattacharai, N.; Gunn, J.; Zhang, M.:** Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1): 83-99, 2010.
9. **Schmidt, O.; Mizrahi, J.; Elisseeff, J.; Seliktar, D.:** Immobilized fibrinogen in PEG hydrogels does not improve chondrocyte-mediated matrix deposition in response to mechanical stimulation. *Biotechnology and Bioengineering*, 95(6): 1061-9, 2006.
10. **Shapira-Schweitzer, K.; Seliktar, D.:** Matrix stiffness affects spontaneous contraction of cardiomyocytes cultured within a PEGylated fibrinogen biomaterial. *Acta Biomaterialia*, 3(1): 33-41, 2007.
11. **Shapira-Schweitzer, K.; Habib, M.; Gepstein, L.; Seliktar, D.:** A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(2): 213-24, 2009.
12. **Seliktar, D.; Zisch, A. H.; Lutolf, M. P.; Wrana, J. L.; Hubbell, J. A.:** MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *Journal of biomedical materials research Part A*, 68(4): 704-16, 2004.
13. **Seliktar, D.; Nerem, R. M.; Galis, Z. S.:** Mechanical strain-stimulated remodeling of tissue-engineered blood vessel constructs. *Tissue engineering*, 9(4): 657-66, 2003.
14. **Saadi, T.; Nayshool, O.; Carmel, J.; Ariche, A.; Bramnik, Z.; Mironi-Harpaz, I.; et al.:** Cellularized biosynthetic microhydrogel polymers, for intravascular liver tissue regeneration therapy. *Tissue engineering Part A*, 20(21-22): 2850-9, 2014.
15. **Peled, E.; Boss, J.; Bejar, J.; Zinman, C.; Seliktar, D.:** A novel poly(ethylene glycol)-fibrinogen hydrogel for tibial segmental defect repair in a rat model. *Journal of biomedical materials research Part A*, 80(4): 874-84, 2007.
16. **Plotkin, M.; Vaibavi, S. R.; Rufaihah, A. J.; Nithya, V.; Wang, J.; Shachaf, Y.; et al.:** The effect of matrix stiffness of injectable hydrogels on the preservation of cardiac function after a heart attack. *Biomaterials*, 35(5): 1429-38, 2014.
17. **Rufaihah, A. J.; Vaibavi, S. R.; Plotkin, M.; Shen, J. ; Nithya, V.; Wang, J.; et al.:** Enhanced infarct stabilization and neovascularization mediated by VEGF-loaded PEGylated fibrinogen hydrogel in a rodent myocardial infarction model. *Biomaterials*, 34(33): 8195-202, 2013.
18. **Fuoco, C.; Salvatori, M. L.; Biondo, A.; Shapira-Schweitzer, K.; Santoleri, S.; Antonini, S. ; et al. :** Injectable polyethylene glycol-fibrinogen hydrogel adjuvant

- improves survival and differentiation of transplanted mesoangioblasts in acute and chronic skeletal-muscle degeneration. *Skelet Muscle*, 2(1): 24, 2012.
19. **Weyrauch, K. D.; Smollich, A. :** Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Edited, Enke Verlag, Berlin, 1998.
 20. **Cornell, K.:** Textbook of Small Animal Surgery, 3rd Edition. Edited, Saunders Elsevier Science, Philadelphia, 2003.
 21. **Enoch, S.; Leaper, D. J.:** Basic science of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 23(2): 37-42, 2005.
 22. **Mori, R.; Shaw, T. J.; Martin, P.:** Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *Journal of Experimental Medicine*, 205(1): 43-51, 2008.
 23. **Pierce, G. F.; Mustoe, T. A.; Altrock, B. W.; et al.:** Role of platelet-derived growth factor in wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, 45: 319-326, 1991.
 24. **Goldman, R.:** Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Advances in Skin & Wound Care* 17(1): 24-35, 2004.
 25. **Broughton, G.; Janis, J.; Attinger, C.:** The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117(7 Suppl): 12S-34S, 2006.
 26. **Ehrlich, H. P.; Krummel, T. M.:** Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. *Wound Repair and Regeneration* 4(2): 203-210, 1996.
 27. **Fowler, D.:** Surgical complications and wound healing in the small animal practice. Edited, Saunders, Philadelphia, 1993.
 28. **Johnston, D. E:** Le Point Vétérinaire. Edited, Les Editions du Point Vétérinaire, Paris. 1992.
 29. **Pavletic, M. M.:** Atlas of small animal reconstructive surgery, 3rd Edition. Edited, Wiley-Blackwell, Philadelphia, 1993.
 30. **Sherding, R. G.:** The Cat: Diseases and Clinical Management, 2nd Edition. Edited, Saunders, Edinburgh, 1994.
 31. **Swaim, S. F.:** Small animal wound management. Edited, Lea & Febiger, Malvern, 1990.
 32. **Waldron, D. R.; Trevor, P.:** Textbook of small animal surgery, 2nd Edition, Edited, Saunders, Philadelphia, 1993.
 33. **Harari, J.:** Surgical complications and wound healing in the small animal practice. Edited, Saunders, Philadelphia, 1993.
 34. **Fowler, D.; Williams, J. M.; Remedios, A.:** Complications of wound healing Manual of canine and feline wound management and reconstruction. 1st Edition, Edited, BSAVA (British Small Animal Veterinary Association), Gloucester, 1999.
 35. **Swaim, S. F.; Hinkle, S. H.; Bradley, D. M.:** Wound contraction: basic and clinical factors. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian -North American Edition-*, 23(1): 20-33, 2001.
 36. **Fowler, D.; Williams, J. M.:** Open wound management. Manual of canine and feline wound management and reconstruction. 1st Edition, Edited, BSAVA (British Small Animal Veterinary Association), Gloucester, 1999.
 37. **Purna, S. K.; Babu, M.:** Collagen based dressing-a review. *Burns*, 26(1): 54-62, 2000.
 38. **Queen, D.; Orsted, H.; Sanada, H.; Sussman, G.:** A dressing history. *International Wound Journal*, 1(1): 59-77, 2004.
 39. **Falabella, A. F.:** Debridement and wound bed preparation. *Dermatologic Therapy*, 19(6): 317-325, 2006.

40. **Miller, C. W.:** Bandages and drains. Textbook of small animal surgery. 2nd Edition, Edited, Saunders, Philadelphia, 1993.
41. **Winter, G.D.:** Effect of air exposure and occlusion on experimental human skin wounds. *Nature*, 200: 378-9, 1963.
42. **Lay-Flurrie, K.:** The properties of hydrogel dressings and their impact on wound healing. *Professional Nurse*, 19(5): 269-73, 2004.
43. **Jones, A.; Vaughan, D.:** Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: a review. *Journal of Orthopaedic Nursing*, 9: S1-S11, 2005.
44. **Thomas, S.; Hay, N. P.:** In vitro investigations of a new hydrogel dressing. *Journal of Wound Care*, 5(3): 130-1, 1996.
45. **Sprung, P.; Hou, Z.; Ladin, D.A.:** Hydrogels and hydrocolloids: an objective product comparison. *Ostomy Wound Management*, 44(1), 36-53, 1998.
46. **Thomas, S.; Hay, P.:** Fluid handling properties of hydrogel dressings. *Ostomy Wound Management*, 41(3): 54-6, 58-9, 1995.
47. **Eisenbud, D.; Hunter, H.; Kessler, L.; Zulkowski, K.:** Hydrogel wound dressings: where do we stand in 2003? *Ostomy Wound Management*, 49(10): 52-7, 2003.
48. **Williams, C.:** Intrasite Gel: a hydrogel dressing. *British Journal of Nursing*, 3(16): 843-6, 1994.
49. **Williams, C.:** Granugel: hydrocolloid gel. *British Journal of Nursing*, 5(3), 188-190, 1996.
50. **Cable, B.:** Hydrogel dressings. *Journal of Human Lactation*, 17(4): 295, 2001.
51. **Tavadia, S.; Bianchi, J.; Dawe, R. S.; et al. :** Allergic contact dermatitis in venous leg ulcer patients. *Contact Dermatitis*, 48(5) : 261-5, 2003.
52. **Smith, I. M.; Keay, D. G.; Buxton, P. K.:** Contact hypersensitivity in patients with chronic otitis externa. *Clinical Otolaryngology and Allied Sciences*, 15(2): 155-8, 1990.
53. **Heine, G.; Schnuch, A.; Uter, W.; Worm, M.:** Frequency of contact allergy in German children and adolescents patch tested between 1995 and 2002: results from the Information Network of Departments of Dermatology and the German Contact Dermatitis Research Group. *Contact Dermatitis*, 51(3): 111-7, 2004.
54. **Lewis, R.; Whiting, P.; ter Riet, G.; O'Meara, S.; Glanville, J.:** A rapid and systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of debriding agents in treating surgical wounds healing by secondary intention. *Health Technology Assessment*, 5(14): 1-131, 2001.
55. **Hollinworth, H.:** Managing a patient with an infected foot ulcer. *Journal of Wound Care*, 2: 22-6, 1993.
56. **Notroff, P.; Loffler, G.:** The successful management of a patient with an infected wound enhancing patient comfort. *European Wound Management Association*, Hull, 1996.
57. **Polignano, R.; Vannucchi, P. L.; Monaldi, M.; Sassi, R.:** Hydrogel in combination with povidone iodine in the treatment of infected diabetic/arterial ulcers. *European Wound Management Association*, Amsterdam, The Netherlands, 1997.
58. **Wichterle, O.; Lim, D.:** Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185: 117-118, 1960.
59. **Wichterle, O.:** Reshaping a xerogel by mechanical removal and swelling to form a hydrogel contact lens. US Patent 3361858, 1968.

60. **Ruben, M.:** Soft Contact Lenses: Clinical and Applied Technology. Edited, Wiley, New York, 1978.
61. **Yannas, I. V.; Lee, E.; Orgill, D. P.; et al.:** Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86(3): 933-7, 1989.
62. **Kashyap, N.; Kumar, N.; Ravi Kumar, M. N. V. R.:** Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 22(2):107–150, 2005.
63. **Jen, A. C.; Wake, M. C.; Mikos, A. G.:** Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(4): 357–64, 1996.
64. **Hoffman, A. S.:** Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1): 3–12, 2002.
65. **Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H.:** Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1): 27–46, 2000.
66. **Peppas, N. A.:** Hydrogels in medicine and pharmacy. Edited, CRC Press, Boca Raton 1986.
67. **Deligradis, K.; Tadele, S. T.; Olthuis, W.; van der Berg, A.:** Hydrogel-based devices for biomedical applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 147(2): 765-774, 2010.
68. **Hennink, W. E.; van Nostrum, C. F.:** Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1): 13-36, 2002.
69. **Patel, A.; Mequanint, K.:** Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges, Edited, Intech Edition, Rijeka, 2011.
70. **Rolland, L.:** Propriétés physico-chimiques de capsules d'hydrogel à cœur liquide. *Matériaux*. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2013.
71. **Lin, C.-C.; Metters, A. T.:** Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13): 1379–408, 2006.
72. **Augst, A. D.; Kong, H. J.; Mooney, D. J.:** Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6(8): 623–633, 2006.
73. **Lutolf, M. P.; Lauer-Fields, J. L.; Schmoekel, H. G.; Metters, A. T.; Weber, F. E.:** Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9): 5413-5418, 2003.
74. **Gibson, D.; Cullen, B.; Legerstee, R.; Harding, K. G.; Schultz, G.:** MMPs Made Easy. *Wounds International*, 1(1), 2009.
75. **Page-McCaw, A.; Ewald, A. J.; Werb, Z.:** Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3): 221-33, 2007.
76. **Parks, W. C.:** Matrix metalloproteinases in repair. *Wound Repair and Regeneration*, 7(6): 423-32, 1999.
77. **Martino, M. M.; Mochizuki, M.; Rotheffluh, D. A.; et al.:** Controlling integrin specificity and stem cell differentiation in 2D and 3D environments through regulation of fibronectin domain stability. *Biomaterials*, 30(6): 1089-97, 2009.
78. **Martino, M. M.; Tortelli, F.; Mochizuki, M.; et al.:** Engineering the growth factor microenvironment with fibronectin domains to promote wound and bone tissue healing. *Science Translational Medicine*, 3(100): 100ra89, 2011.

79. **Discher, D. E.; Mooney, D. J.; Zandstra, P. W.:** Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 324(5935): 1673-77, 2009.
80. **Hutmacher, D. W.:** Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 12(1): 107-24, 2001.
81. **Anseth, K. S.; Bowman, C. N.; Brannon-Peppas, L.:** Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials*, 17(17): 1647-1657, 1996.
82. **Kim, B.; Peppas, N. A.:** Poly(ethylene glycol)-containing hydrogels for oral protein delivery applications. *Biomedical Microdevices*, 5(4): 333-341, 2003.
83. **Drumheller, P. D., Hubbell, J. A.:** Handbook of biomedical engineering. Edited, CRC Press, Boca Raton, 1995.
84. **Sefton, M. V.; Stevenson, W. T. K.:** Microencapsulation of live animal cells using polyacrylates. *Advances in Polymer Science*, 107: 143-197, 1993.
85. **Chang, T. M. S:** Hybrid artificial cells: microencapsulation of living cells. *Official Journal of American Society for Artificial Internal Organs*, 38: 128-130, 1992.
86. **Nyberg, S. L.; Remmel, R. P.; Mann, H. J.; Peshwa, M. V.; Hu, W. S.; Cerra, F. B.:** Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. *Annals of Surgery*, 220(1): 59-67, 1994.
87. **Shatford, R. A.; Nyberg, S. L.; Meier, S. J.; White, J. G.; Payne, W. D.; Hu, W. S. , Cerra, F. B.:** Hepatocyte function in a hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver. *Journal of Surgical Research*, 53(6): 549-557, 1992.
88. **Leach, J. B.; Bivens, K. A.; Collins, C. N.; Schmidt, C. E.:** Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 70(1): 74-82, 2004
89. **Leach, J. B.; Schmidt, C. E:** Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 26(2): 125-135, 2005.
90. **Gonen-Wadmany, M.; Goldshmid, R.; Seliktar, D.** Biological and mechanical implications of PEGylating proteins into hydrogel biomaterials. *Biomaterials*, 32(26): 6025-33, 2011.
91. **Dikovsky, D.; Bianco-Peled, H.; Seliktar, D.:** The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration. *Biomaterials*, 27(8):1496-506, 2006.
92. **Gonen-Wadmany, M.; Oss-Ronen, L.; Seliktar, D.:** Protein-polymer conjugates for forming photopolymerizable biomimetic hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*, 28(26): 3876-86, 2007.
93. **Nerem, R. M.; Seliktar, D.:** Vascular tissue engineering. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 3: 225-43, 2001.
94. **Seliktar D.:** Extracellular stimulation in tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1047: 386-94, 2005.
95. **Frisman, I.; Seliktar, D.; Bianco-Peled, H.:** Nanostructuring of PEG-fibrinogen polymeric scaffolds. *Acta Biomaterialia*, 6(7): 2518-24, 2010.
96. **Elisseeff, J.; McIntosh, W.; Anseth, K.; Riley, S.; Ragan, P.; Langer, R.:** Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(2): 164-71, 2000.
97. **Nguyen, K. T.; West, J. L.:** Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 23(22): 4307-14, 2002.

- 98. Russel, W. M. S.; Burch, R., L.:** The Principles of Humane Experimental Technique. Edited, Methuen, London, 1959.
- 99. Cross, S. E.; Naylor, I. L.; Coleman, R. A.; Teo, T. C.:** An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *British Journal of plastic surgery*, 48(4): 189-97, 1995.
- 100. Gottrup, F.; Agren, M. S.; Karlsmark, T.:** Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society (and) the European Tissue Repair Society*, 8(2): 83-96, 2000.
- 101. Dorsett-Martin, W.A.:** Rat models of skin woundhealing: a review. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society (and) the European Tissue Repair Society*, 12(6): 591-9, 2004.
- 102. Gallant-Behm, C. L.; Hart, D. A.:** Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model. *Wound Repair and Regeneration : Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 14(1): 46-54, 2006.
- 103. Bohling, M. W.; Henderson, R. A.; Swaim, S. F.; Kincaid, S. A.; Wright, J. C :** Cutaneous wound healing in the cat: a macroscopic description and comparison with cutaneous wound healing in the dog. *Veterinary surgery*, 33(6): 579-87, 2004.
- 104. Teller, P.; White, T.:** The physiology of wound healing: injury through maturation. *Surgical Clinics of North America*, 89: 599, 2009.
- 105. Gabbiani, G.:** The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Journal of Pathology*, 200(4): 500-503. 2003.
- 106. Darby, I.; Skalli, O.; Gabbiani, G.:** Alpha- smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Laboratory Investigation* 63: 21-29, 1990.
- 107. Wang, X.- Q.; Kravchuk, O.; Winterford, C.; Kimble, R. M.:** The correlation of in vivo burn scar contraction with the level of alpha-smooth muscle actin expression. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 37: 1367-1377, 2001.
- 108. Desmoulière, A.; Redard, M.; Darby, I.; Gabbiani, G.:** Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American Journal of Pathology*, 146(1): 56-66, 1995.
- 109. Tonnesen, M. G.; Feng, X.; Clark R. A.:** Angiogenesis in wound healing. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / The Society for Investigative Dermatology, Inc.(and) European Society for Dermatological Research*, 5(1): 40-6, 2000.
- 110. Squier, C. A.:** The effect of stretching on formation of myofibroblasts in mouse skin. *Cell and Tissue Research*, 220(2): 325-335, 1981.
- 111. Grinnell, F.; Zhu, M.; Carlson, M. A.; Abrams, J. M.:** Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Experimental Cell Research*, 248: 608-619, 1999.
- 112. Tomasek, J. J.; Haaksma, C. J.; Eddy, R. J.; Vaughan, M. B.:** Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. *The Anatomical Record*, 232(3): 359-368, 1992.

- 113.Arora, P. D.; Narani, N.; McCulloch, C. A. G.:** The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *American Journal of Pathology*, 154(3): 871-882, 1999.
- 114.Hinz, B.; Mastrangelo, D.; Iselin, C. E.; Chaponnier, C.; Gabbiani, G.:** Mechanical Tension Controls Granulation Tissue Contractile Activity and Myofibroblast Differentiation. *American Journal of Pathology*, 159(3): 1009-1020, 2001.
- 115.Lee, K. Y.; Peters, M. C.; Anderson, K. W.; Mooney, D. J.:** Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature*, 408(6815), 998-1000, 2000.
- 116.Tabata, Y.; Matsui, Y.; Ikada, Y.:** Growth factor release from amylopectin hydrogel based on copper coordination. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 56(1-3): 135-148, 1998.
- 117.Çelebi, N.; Erden, N.; Gönül, B.; Koz, M.:** Effects of epidermal growth factor dosage forms on dermal wound strength in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(5): 386-387, 1994.
- 118.Shea, L. D.; Smiley, E.; Bonadio, J.; Mooney, D. J.:** DNA Delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nature Biotechnology*, 17(6): 551-554, 1999.
- 119.Cox, D. A.:** Transforming growth factor-beta 3. *Cell biology international*, 19(5): 357-71, 1995.
- 120.Lu, L.; Saulis, A. S.; Liu, W. R.; Roy, N. K.; Chao, J. D.; Ledbetter, S.; and Mustoe, T. A.:** The temporal effects of anti-TGF-beta 1, 2, and 3 monoclonal antibody on wound healing and hypertrophic scar formation. *Journal of the American College of Surgeons*, 201 (3): 391-7, 2005.
- 121.Martinez-Ferrer, M.; Afshar-Sherif, A. R.; Uwamariya, C.; de Crombrugghe, B.; Davidson, J. M.; and Bhowmick, N. A.:** Dermal transforming growth factor-beta responsiveness mediates wound contraction and epithelial closure. *The American journal of pathology*, 176(1): 98-107, 2010.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA :	acrylic acid/Acrylsäure
Abb. :	Abbildung
ad. us. vet :	ad usum veterinarium
AEC:	Aminoethyl Carbazol
α -SMA:	α -smooth muscle actin : Aktin der glatten Muskulatur
bFGF:	Basic Fibroblast growth factor
bzw.:	beziehungsweise
ca.:	circa
DCM:	Dichloromethan
DNA:	Desoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
EDA FN:	Extra Domain A containing cellular Fibronectin
EGDA :	Ethylenglykoldiakrylat
EGDMA:	Ethylenglykoldimethylakrylat
EGA:	Ethylenglykolakrylat
EGMA:	Ethylenglykolmethakrylat
EGF:	Epidermal growth factor
F-Actin:	Aktinfilament
FGF:	Fibroblast growth factor
FN III 9-10:	Fibronectin's central cell-binding Domaine
G:	Gauge
g:	Gramm
ggf.:	Gegebenenfalls
HE:	Hämatoxilin Eosin
HEMA:	Hydroxyethyl methacrylat
HPMA:	N-(2-Hydroxypropyl) methacrylate
H ₂ O ₂ :	Wasserstoffperoxid
IGF-1:	Insulin-like growth factor1
IVC:	Individually Ventilated Cages
kDa:	Kilodalton
KGF:	Keratinocyte growth factor
KGW:	Körpergewicht
l:	Liter
M:	Molare Masse
MG:	Molekulargewicht

mg/kg:	Milligramm pro Kilogramm
mg/ml:	Milligramm pro Milliliter
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mM:	Millimol
mm ² :	Quadratmillimeter
MMP:	Matrix-Metalloproteinasen
m/v:	Massenkonzentration
MW:	Molecular Weight
mV/cm ² :	Millivolt je Quadratzentimeter
NaN ₃ :	Natriumazid
NIPAAm:	N-Isopropyl Akrylamid
NVP:	N-Vinyl-2-Pyrrolidon
-OH:	Abkürzung für Hydroxygruppe
PAA:	Polyacrylic acid
PBS:	Phosphate buffered saline
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PEG:	Polyethylenglykol
PEG-DA:	Polyethylenglykol-Diakrylat
PEG-OH:	Polyethylenglycol-hydroxyl
PVA:	Polyvinylalcohol
PVAc :	Polyvinylacetat
Tab.:	Tabelle
TCEO:	Tris(2-carboxyethyl)Phosphin
TCEP HCL:	Tris(2-carboxyethyl)Phosphin Hydrochlorid
TGF:	Transforming Growth Factor
TGF- α :	Transforming Growth Factor alpha
TGF- β :	Transforming Growth Factor beta
TGF- β 1 :	Transforming Growth Factor-beta 1
TGF- β 3:	Transforming Growth Factor-beta 3
TGF- β -RII:	Transforming Growth Factor beta receptor II
UV:	Ultraviolett
VAC:	Vinylacetat
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
Vol%:	Volumenprozent
W/cm ² :	Watt per Quadratzentimeter

w/v:	weight/volume
λ :	Lambda (Formelzeichen für Wellenlänge)
I:	Formelzeichen für Bestrahlungsstärke/Strahlungsstromdichte
Ø:	Formelzeichen für Durchmesser
μm :	Mikrometer
z.B.:	Zum Beispiel

10. ANHANG

10.1. ABBILDUNGEN

10.1.1. IN VIVO STUDIE

Operation



Abb.1:
Hydrogelbildung vor der Implantation in die Hautwunde

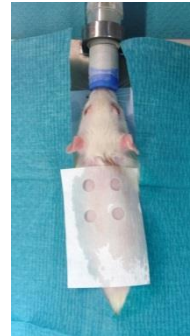


Abb.2:
Ratte in Narkose mit Lage-Schablone
kurz vor dem Stanzen der 4 Hautwunden



Abb.3:
Hydrogelapplikation in die Hautwunde



Abb.4:
Gelierung des Hydrogels in situ durch UV-Licht

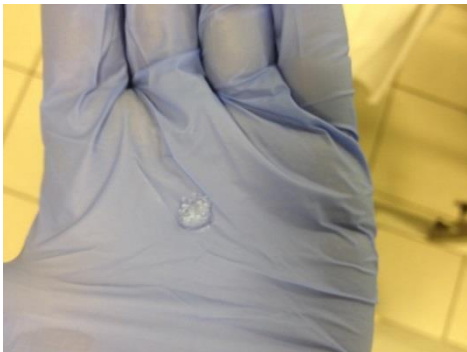


Abb.5:
Makroskopisches Aussehen des PEG-Fibrinogen Hydrogel



Abb.6:
Sekundäre Schicht des Verbandes: Urogecell Lite®
fixiert mit Supramid® 4-0



Abb. 7
Tertiäre Schicht des Verbandes: Klebendes Fixierpflaster Leukoplast®



Abb. 8
Ratte 03 der 7-Tages-Gruppe
am Tag der Operation



Abb. 9
Ratte 03 der 7-Tages-Gruppe
am Tag der Euthanasie

(Wundbehandlung: vorne links: PEG-Fibrinogen Hydrogel, vorne rechts: ohne Behandlung, hinten links: ohne Behandlung, hinten rechts: PEG-Fibrinogen Hydrogel)



Abb. 10
Ratte 04 der 14-Tage-Gruppe
am Tag der Operation



Abb. 11
Ratte 04 der 14-Tage-Gruppe
am Tag des Verbandswchsel
(7 Tage nach der Operation)



Abb. 12
Ratte 04 der 14-Tage-Gruppe
am Tag der Euthanasie

(Wundbehandlung: vorne links: PEG-Fibrinogen Hydrogel, vorne rechts: ohne Behandlung, hinten links: ohne Behandlung, hinten rechts: PEG-Fibrinogen Hydrogel)

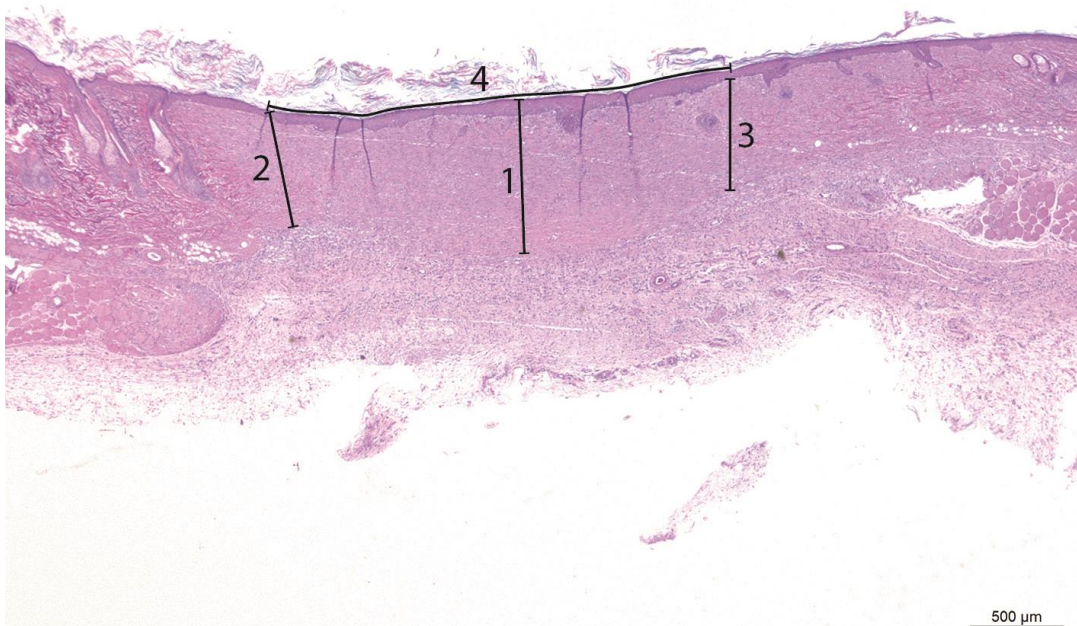


Abb. 13: Histologischer Schnitt, Querschnitt durch die verheilte Wunde, Ratte 43.05, caudal rechts, ohne Behandlung, 14Tage post operativ , HE-Färbung (Objektiv 20x)
Messungen 1. Dicke der Wunde in der Mitte 2. Dicke der Wunde am linken Wunderand 3. Dicke der Wunde am rechten Wunderand 4. Länge des Hautdefektes



Abb. 14: Histologischer Schnitt, Querschnitt durch die verheilte Wunde, Ratte 43.05, caudal rechts, ohne Behandlung, 14 Tage post operativ (Objektiv 20x). Immunhistologischer Nachweis von α -SMA in Gefäßwänden (dünne Pfeile) und in Myofibroblasten (dicke Pfeile)

11. DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich sowohl bei der Anfertigung meiner Dissertation, als auch während meiner Zeit als Doktorandin unterstützt haben:

Allen voran gilt mein Dank meiner Doktormutter **Prof. Brigitte von Rechenberg** für die Überlassung des Themas und den professionellen Ablauf des Projektes.

Einen besonderen herzlichen Dank gilt meinen Betreuern **Dr. med. vet. Claudio Venzin**, und **Dr. med. vet. Katja Nuss** für die Planung des Projektes, die professionellen und reibungslosen Abläufe der Operations- und Auswertungstage, für die Freiheiten und das Vertrauen bei der Durchführung des Projektes. Danke für die Hilfe.

Für die Übernahme des Korreferats bedanke ich mich sehr herzlich bei **Prof. em. Hans Geyer**.

Für die Herstellung des Hydrogels, die internationale Zusammenarbeit und das Vertrauen bei der Durchführung der Studie bedanke ich mich sehr herzlich bei **Prof. Dror Seliktar** und **Alexandra Berdichevski**.

Vielen Dank auch an **Dr. med. vet. Agnieszka Karol** für die Hilfestellung bei der Auswertung, die Verfügbarkeit und die angenehme Zusammenarbeit.

Ein riesiges Dankeschön für die professionelle, reibungslose und tolle Zusammenarbeit bei der Anfertigung der histologischen Präparate geht an: **Ladina Ettinger Ferguson, Aymone Lenisa und Kati Zlinsky**.

Flora Nicholls danke ich ganz herzlich für die wahnsinnig liebevolle Betreuung der Ratten rund um die Operationen und für die Durchführung der Anästhesien.

Einen besonderen Dank gilt **Dr. med. vet. Lucas Adam Smolders, PhD** für die fachliche Unterstützung in der Statistik und vor allen für die menschliche Unterstützung und die stets motivierende Worte. Bei Fragen hat er mit immer hilfsbereit und kompetent zur Seite gestanden. Er hat mir beigebracht, an wissenschaftliche Arbeit heranzugehen und mein Interesse für die Forschung immer unterstützt.

A mon papa et ma maman qui m'ont portée jusque là où je suis aujourd'hui, pour leur présence et leur amour à toute épreuve, pour m'avoir transmis des valeurs essentielles comme la persévérance, la volonté et la recherche constante du travail bien fait. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, d'avoir cru en ma réussite et de m'avoir donné les moyens de réaliser mes projets. Les paroles manquent souvent mais les mots sont là pour les exprimer : je vous aime fort.

A mon frère et à ma sœur pour notre impérissable complicité, pour les modèles de volonté que vous êtes pour moi, pour votre présence et votre amour dans les moments importants. Je vous souhaite le bonheur et l'épanouissement et d'atteindre ce que vous méritez. Je vous aime fort.

A Mehdy mon amour, merci de m'avoir soutenue toute la durée de mes études et pendant la réalisation de mon doctorat. Pour ces nombreuses années passées ensemble et les nombreuses autres qui nous attendent, parce que ce n'est plus un début et que je vois déjà la suite à deux, être à tes côtés est un bonheur au quotidien. Je t'aime.

12. CURRICULUM VITAE

Vorname Name	Valentine Jacot
Geburtsdatum	27.01.1987
Geburtsort	La Chaux-de-Fonds (NE)
Nationalität	Schweizerin
Heimatort	Le Locle (NE), La Chaux-de-Fonds (NE)
08/1993 - 08/1998	Primarschule la Jaluse, le Locle, Schweiz
08/1998 - 08/1999	Primarschule Beau-Site, le Locle, Schweiz
08/1999 - 08/2002	Sekundärschule Jehan-Droz, le Locle, Schweiz
08/2002 - 06/2005	Gymnasium Blaise-Cendrars, La Chaux-de-Fonds, Schweiz
29/06/2005	Maturaabschluss am Gymnasium Blaise-Cendrars La Chaux-de-Fonds, Schweiz
09/2005 - 10/2011	Studium der Veterinärmedizin mit dem Schwerpunkt Kleintiere an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Schweiz
17/10/2011	Abschlussprüfung vet. med. an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Schweiz
10/2013 - 12/2016	Anfertigung der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet Brigitte von Rechenberg am Departement für Pferde, Musculoskeletal Research Unit (MSRU) der Vetsuisse Fakultät Zürich Direktor Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst
04/2012 - 10/2012	Assistenzärztin/Praktikantin in verschiedenen Kleintierpraxen in der Schweiz, u.a. in der Kleintierchirurgie Vetsuisse Fakultät der Universität Zürich
10/2012 - 11/2013	Internship an der Klinik für Kleintierchirurgie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, Schweiz
10/2013 - 03/2016	Assistenzärztin und Doktorandin der Abteilung für Kleintierchirurgie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, Schweiz
seit 04/2016	Assistenzärztin in der Kleintierpraxis Nidegger et Associés, Ecublens, Schweiz